



**Paula Maria da Costa
Vieira Neto**

**Compostos voláteis associados a defeitos de cortiça
de *Quercus suber* L.: Estudo dos efeitos de matriz
por micro-extracção em fase sólida na região de
espaço de cabeça**



**Paula Maria da Costa
Vieira Neto**

**Compostos voláteis associados a defeitos de cortiça
de *Quercus suber* L.: Estudo dos efeitos de matriz
por micro-extracção em fase sólida na região de
espaço de cabeça.**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Instrumentais e Controlo da Qualidade Analítica, realizada sob a orientação científica do Doutor Armando Silvestre, Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Sílvia M. Rocha, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Dulce e Adão, e aos meus filhos
Filipa, Rita e Ricardo

o júri

presidente

Prof. Dr. Armando da Costa Duarte
professor Catedrático da Universidade de Aveiro

Prof. Dra. Ana Maria Costa Freitas Drumond Ludovice
professora Associada com Agregação da Universidade de Évora

Prof. Dr. Armando Jorge Domingues Silvestre
professor Associado da Universidade de Aveiro

Prof. Dra. Sílvia Maria Rocha Simões Carriço
professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao Doutor Armando Silvestre e à Doutora Sílvia M. Rocha pela orientação científica, sugestões, incentivo e confiança demonstradas.

Ao Marco Tavares e ao Sr. Alberto Tavares pela recolha da cortiça e sua transformação industrial.

Ao Sr. Fernando Oliveira e à Dra Susana Santos pelo apoio na realização dos ensaios cromatográficos (GC/MS)

Ao Sr. Emílio Campos (Emílio de Azevedo Campos, SA) pela cedência graciosa das fibras e septos de micro-extracção em fase sólida.

A todos os colegas e amigos que sempre me incentivaram e motivaram na realização deste trabalho.

A toda a minha família, em especial ao meu irmão Pedro Cosme, Professor Auxiliar da Faculdade de Economia da Universidade do Porto, pelo apoio na análise estatística.

palavras-chave

Cortiça, HS-SPME, efeito de matriz, cortiça normal, cortiça bolor, cortiça mancha amarela, *off-flavours*, compostos voláteis, *A. Mellea*.

resumo

A cortiça é o material de eleição para o fabrico de vedantes para garrafas de vinho. No entanto, sendo um produto natural, a cortiça pode ser contaminada e atacada de diferentes formas, o que pode promover alterações nas suas propriedades.

Um dos problemas mais críticos é o aparecimento de alterações organolépticas em vinhos, cujas causas têm vindo a ser atribuídas à migração de compostos de aroma indesejável, existentes na cortiça. Estes compostos, na sua maioria relacionados com a actividade microbiológica, podem ter a sua origem no facto da cortiça, desde a floresta até ao engarrafamento, ser susceptível de sofrer degradações microbiológicas com consequente formação de metabolitos secundários voláteis, alguns dos quais com aromas indesejáveis. A grande maioria dos estudos sobre este problema tem incidido na quantificação do 2,4,6-tricloroanisole (TCA), considerado um marcador de defeito pois ocorre em cerca de 80% dos casos de alteração organoléptica. A técnica de microextração em fase sólida na região de espaço de cabeça (HS-SPME) tem vindo a ser utilizada na análise da fracção volátil de vinhos e no controlo da qualidade das rolhas de cortiça. Esta técnica tem sido, ainda, utilizada na análise de vinhos e cortiças com defeitos organolépticos, especialmente na detecção e quantificação do TCA. Considerando que são conhecidos outros compostos, associados à cortiça, susceptíveis de provocar defeitos de aroma em vinhos será importante estudar a aplicabilidade da técnica de HS-SPME na sua análise.

Assim, com este trabalho pretendeu-se desenvolver uma metodologia de HS-SPME para identificar e quantificar compostos voláteis da cortiça susceptíveis de provocar defeitos sensoriais em vinhos: 3-metil-1-butanol (3-MB), 1-octeno-3-ol (1-Oct-3), 1-octanol (1-Oct), guaiacol (Gua), 2-metilisoborneol (MIB), 2,4,6-tricloroanisole (TCA) e geosmina (Geo).

O estudo de optimização da metodologia incidiu sobre: i) temperatura de extração, ii) linearidade global, iii) linearidade e reprodutibilidade relativamente a cada padrão e estimativa dos Factores Relativos de Resposta da metodologia de SPME e iv) avaliação dos efeitos de interferência da concentração de um composto sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz.

Após a fase de optimização procedeu-se à pesquisa destes compostos padrão em simulantes de vinho que estiveram em contacto durante treze meses com cortiça normal (N) e cortiça com defeitos: bolor (B) e mancha amarela (MA). Foram preparadas soluções padrão em simulantes de vinho em gamas de concentração que incluem os limites de percepção sensorial (LPS) dos diversos compostos: 3-MB (47,7-191,0 mg/L), 1-Oct-3 (10,7-42,7 µg/L), 1-Oct (20,8-208,0 µg/L), Gua (5,2-51,6 µg/L), MIB (8,0-80,0 ng/L), TCA (2,0-19,8 ng/L) e Geo (8,4-84,0 ng/L). As amostras foram analisadas em modo espaço-de-cabeça usando uma fase estacionária do tipo absorvente, a polidimetilsiloxano (PDMS), de 100 µm de espessura.

Do trabalho realizado, destacam-se como principais conclusões:

i) Os compostos estudados têm comportamentos distintos em HS-SPME, o que pode ser observado através dos diferentes valores de Log(FRR), que dependem das suas características físico-químicas (solubilidade em água, volatilidade, pressão de vapor e coeficiente de partição fase líquida vs fase gasosa);

ii) Apesar de se ter trabalhado numa gama de concentrações em que se verifica uma resposta linear da fibra relativamente à concentração total da matriz, verificou-se que a variação da concentração do 1-Oct (20,8 – 208,0 µg/L) interfere na quantificação dos restantes componentes, com excepção do 1-Oct-3. Este efeito ocorre de forma positiva para o 3-MB e negativa para o Gua, MIB, TCA e Geo. O 1-Oct apresenta o maior valor de Log(FRR) (4,9), e causa interferência em todos os compostos com valores de Log(FRR) menores mas não naquele que tem um valor de Log(FRR) próximo do seu, no caso o 1-Oct-3 (Log(FRR)= 4,3).

A variação da concentração de 1-Oct levou à observação de erros de determinação dos restantes compostos, com coeficientes de variação de 13,8, 39,5, 53,7, 67,1, 62,2% para o 3-MB, Gua, MIB, TCA e Geo, respectivamente. Uma vez que o 1-Oct faz parte da composição química, quer de vinhos quer da cortiça, em quantidades que variam entre 3 e 250 µg/L, o efeito observado pode explicar a existência de discrepâncias entre a análise sensorial de determinado composto e a sua quantificação por HS-SPME.

iii) Finalmente, os compostos em estudo foram pesquisados em simulantes de vinho rolhados com cortiça N, B e MA, de acordo com a metodologia desenvolvida. O único composto identificado, foi o TCA, com concentrações de 0,6, 0,4 e 2,4 ng/L, para os simulantes rolhados com a cortiça N, B e MA, respectivamente.

Verifica-se que 25% dos simulantes rolhados com cortiça N e 35% dos rolhados com cortiça B apresentam TCA, encontrando-se todos os valores abaixo do LPS (4 ng/L). Estes resultados indicam que nenhum dos simulantes rolhados com cortiça N e B seria susceptível de apresentar defeitos de aroma associados aos descritores de aroma dos sete compostos estudados. No caso dos simulantes rolhados com cortiça MA, foi detectada a presença de TCA em 65% dos simulantes, dos quais 35% apresentavam concentrações superiores ao LPS. Assim, 35 % dos simulantes rolhados com cortiça MA são susceptíveis de apresentar defeitos de aroma.

keywords

Cork, HS-SPME, matrix effect, normal cork, mould cork, yellow stain cork, Mancha amarela, off-flavours, cork volatiles, *A. mellea*.

abstract

Cork is the premium raw material used to produce wine-bottling stoppers; however, being a natural product, cork can be contaminated and attacked in different ways that could promote modifications in its proprieties. One of the most critical problems of the cork industry is that wine may be organoleptically affected, due to off-flavours migration from cork. These compounds, mostly related with microbiological activity, may have its origin in the fact that cork is susceptible of microbiological attack during cork processing from the forest to the bottle, with production of off-flavours metabolites. Most studies on this problem are dedicated to 2,4,6-trichloroanisole (TCA) quantification, once it is present in around 80% of the organoleptically deviation cases.

The headspace solid phase microextraction methodology (HS-SPME) has been used in the analysis of wines with organoleptic deviations, and in cork stoppers quality control, with particular emphasis on the detection of TCA. Considering wine organoleptic deviations can be due to other cork off-flavours components, it is important to implement this technique to their determination. The present study aims to develop an HS-SPME methodology to identify and quantify cork volatile components that could produce a wine organoleptic deviations, namely: 3-methyl-1-butanol (3-MB), 1-octen-3-ol (1-Oct-3), 1-octanol (1-Oct), guaiacol (Gua), 2-methylisoborneol (MIB), 2,4,6-trichloroanisole (TCA) and geosmine (Geo).

The methodology optimization study has considered the following aspects: *i*) extraction temperature, *ii*) global linearity, *iii*) linearity and reproducibility to each compound and estimative of SPME Relative Response Factors and *iv*) analysis of interference effects of the concentration of each compound over the chromatographic areas of the other compounds.

After the optimization step, the studied compounds were searched in wine simulants stoppered with standard (N) and defective cork: moulds (B) and yellow stain (MA).

Standard solutions in wine simulants were prepared, in concentration ranges including the sensorial perception limits (LPS) of the studied compounds: 3-MB (47,7-191,0 mg/L), 1-Oct-3 (10,7-42,7 µg/L), 1-Oct (20,8-208,0 µg/L), Gua (5,2-51,6 µg/L), MIB (8,0-80,0 ng/L), TCA (2,0-19,8 ng/L) and Geo (8,4-84,0 ng/L), using a polydimethylsiloxane (PDMS) fiber, with 100 µm thickness.

The main conclusions arising from the experimental results are:

i) The studied compounds have different HS-SPME behaviour, observed by the different Log(FRR) values, which depend on the physical and chemical properties (water solubility, volatility, vapour pressure and liquid phase vs gaseous phase partition).

ii) Although the work was carried out in a concentration range in which it is observed a global linearity in fiber response in relation to the total concentration, the variation of the 1-Oct concentration (from 20,8 to 208,0 µg/L) interferes in the quantification of the other components, with exception of 1-Oct-3. This effect is positive to 3-MB, and negative to Gua, MIB, TCA and Geo and is related with changes in headspace composition and sorption in the fibre. 1-Oct is the component with the higher Log (FRR) value (4,9), interfering with all compounds with lower Log(FRR) values, with no interference in the component with a similar Log(FRR) value, 1-Oct-3 (Log(FRR)= 4,3). The variation of 1-Oct concentration causes errors in the determination of the other components with variation coefficients of 13,8, 39,5, 53,7, 67,1, 62,2% to 3-MB, Gua, MIB, TCA and Geo, respectively. Since 1-Oct is found in the composition of wine and cork in concentrations between 3 and 250 µg/L, the observed effect may explain the existence of discrepancies between sensorial analysis of a compound and its quantification by HS-SPME.

iii) Finally, the studied compounds were searched in wine simulants, stoppered with N, B and MA cork stoppers, according to the studied methodology. Only TCA was detected, with a concentration of 0,6, 0,4 and 2,4 ng/L, in the wine simulants stoppered with N, B and MA cork stoppers, respectively. TCA was detected in 25% of the simulants stoppered with N cork and 35% of the simulants stoppered and B cork, with all determinations below TCA LPS (4 ng/L). These results indicate that none of the simulants stoppered with N and B cork will be susceptible of present off-flavour defects associated to the seven studied compounds. In the case of simulantes stoppered with MA cork, TCA was detected in 65% of the wine simulants, 35% of them with values higher than the TCA LPS. Thus 35% of wine simulants stoppered with MA cork are susceptible to present off-flavours.

ÍNDICE

Preâmbulo	5
Parte I. Introdução	7
1.1. Cortiça	9
1.1.1. Produção suberícola	9
1.1.2. Caracterização económica da indústria da cortiça em Portugal	11
1.1.3. Estrutura celular	12
1.1.4. Composição química	12
1.1.5. Ataques microbiológicos	23
1.1.6. Influência da cortiça sobre as características organolépticas do vinho	27
1.2. Micro-extracção em fase sólida	31
1.2.1. Fundamentos teóricos	31
1.2.2. Dispositivos de extracção	33
1.2.3. Modos de extracção	34
1.2.4. Fases estacionárias	37
1.2.5. Influência das condições experimentais	38
1.3. Metodologias SPME na análise de 2,4,6-tricloroanisole em cortiça e em vinho	40
1.4. Enquadramento e objectivos do trabalho	43
Parte II. Materiais e Métodos	45
2.1. Materiais	47
2.1.1. Reagentes e padrões	47
2.1.2. Preparação de rolhas de cortiça (N, B e MA) e posterior engarrafamento	48
2.1.3. Equipamentos	50
2.2. Optimização da metodologia de HS-SPME	52
2.2.1. Efeito da temperatura de extracção	52
2.2.2. Linearidade global da metodologia de HS-SPME	53
2.2.3. Reprodutibilidade e linearidade da metodologia e estimativa dos Factores Relativos de Resposta (FRR)	54
2.2.4. Avaliação dos efeitos de interferência da concentração de um composto sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz	54
2.3. Pesquisa dos compostos-padrão nos simulantes de vinho rolhados com cortiça N, B e MA	55
2.4. Tratamento de dados	56

2.4.1. Temperatura de extracção	56
2.4.2. Linearidade global da metodologia HS-SPME	56
2.4.3. Reprodutibilidade e linearidade da metodologia HS-SPME	57
2.4.4. Estimativa dos Factores Relativos de Resposta	57
2.4.5. Avaliação dos efeitos de interferência da concentração de um composto sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz	57
2.4.6. Pesquisa dos compostos-padrão nos simulantes de vinho rolhados com cortiça N, B e MA	58
Parte III. Resultados e Discussão	59
3.1. Optimização da metodologia HS-SPME	61
3.1.1. Efeito da temperatura de extracção	64
3.1.2. Linearidade global da metodologia HS-SPME	69
3.2. Reprodutibilidade e linearidade da metodologia HS-SPME	71
3.3. Estimativa dos Factores Relativos de Resposta	74
3.4. Avaliação dos efeitos de interferência da concentração de um composto sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz	77
3.4.1. Análise do efeito da variação individual da concentração de cada um dos compostos sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz	77
3.4.2. Análise do efeito da variação da concentração dos compostos constituintes da matriz sobre a área individual de cada um dos compostos	87
3.5. Pesquisa dos compostos padrão nos simulantes de vinho rolhados com cortiça N, B e MA	93
Parte IV. Conclusões	97
Parte V. Bibliografia	103

Lista de abreviaturas e siglas

1-Oct: 1-Octanol

1-Oct-3: 1-Octeno-3-ol

3-MB: 3-Metil-1-butanol

APCOR: Associação Portuguesa de Cortiça

B: Bolor

CAR: Carboxen™

CAS: *Chemical abstract service*

CV: Coeficiente de variação

CW: Carbowax®

DA: Descritor de aroma

DHS-TD: *Dinamic headspace-thermal desorption* (Espaço de cabeça dinâmico - desorção térmica)

SDE: *Simultaneously Distillation Extraction* (Destilação e extracção simultâneas)

DVB: Divinilbenzeno

FRR: Factor Relativo de Resposta

Geo: Geosmina

Gua: Guaiacol

HACCP: *Hazard Analysis and Control of Critical Points* (Análise de perigos e controlo dos pontos críticos)

HS: *Headspace* (espaço de cabeça)

INE: Instituto Nacional de Estatística

LD: Limite de detecção

LLE: *Liquid-Liquid Extraction* (Extracção líquido-líquido)

Log(FRR): Logaritmo do FRR

LogP (oct/ag): Logaritmo do coeficiente de partição octanol/água

LPS: Limite de percepção sensorial

LQ: Limite de quantificação

MA: mancha amarela

MHS-SPME: *Multiple headspace-solid phase microextraction* (múltipla microextração em fase sólida)

MIB: 2-Metilisoborneol

MS: Espectrometria de Massa

m/m: massa/massa

MM: Massa molecular

N: Normal

p.e: Ponto de ebulição

PA: Poliacrilato

PAH': *Polycyclic aromatic hydrocarbons* (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos)

PDMS: Polidimetilsiloxano

PI: Padrão interno

r.p.m. rotação por minuto

SBSE: *Stir bar sorption extraction* (Sorção em barra agitadora)

SPME: *Solid phase microextraction* (microextração em fase sólida)

TCA: 2,4,6-Tricloroanisole

tr: Tempo de retenção

v/v: volume/volume

Preâmbulo

A rolha de cortiça é o vedante de eleição para garrafas de vinho. Do ponto de vista físico-mecânico, as suas propriedades de impermeabilidade e elasticidade conferem-lhe características ímpares, não havendo substituto que permita conciliar um máximo de estanqueidade com um tão longo prazo de aplicação, que chega a ser de décadas¹.

O facto de ser um produto natural torna-a susceptível de sofrer alterações, desde a floresta até ao momento do engarrafamento, as quais podem causar desvios organolépticos de impacto negativo nas bebidas. Estes desvios têm vindo a ser atribuídos a compostos resultantes da actividade microbiológica^{2,3} ou ainda de compostos químicos utilizados no acabamento das rolhas. A contaminação pelo meio ambiente envolvente^{4,5} é igualmente uma das vertentes a considerar. Os compostos voláteis susceptíveis de provocar defeitos apresentam normalmente baixos limites de percepção sensorial, bastando assim a sua presença em concentrações muito baixas, da ordem dos ng/L, para causarem alterações organolépticas nas bebidas que são rolhadas com cortiça, particularmente no vinho. Os processos de migração destes compostos a partir da cortiça e os eventuais efeitos de interacção entre estes na matriz, podem afectar a sua detecção, a nível sensorial e instrumental.

A microextracção em fase sólida (SPME) tem sido amplamente usada para análise de compostos voláteis em vários produtos, nomeadamente a quantificação, em cortiça e vinho, de compostos associados a defeitos, especialmente o 2,4,6-tricloroanisole (TCA). No entanto, por vezes verificam-se algumas discrepâncias entre os dados obtidos por esta metodologia e os da análise sensorial.

A técnica de SPME, comparada com as técnicas clássicas de análise de compostos voláteis, especialmente com a extracção por solventes orgânicos (LLE e SLE), tem como vantagens o facto de não recorrer a solventes, de não necessitar de preparação prévia da amostra, ser facilmente automatizada e ainda permitir a análise dos compostos presentes no espaço de cabeça, os quais são responsáveis pelo aroma dos produtos^{6,7}.

O presente trabalho tem 2 objectivos principais:

- i) Desenvolver uma metodologia de HS-SPME para identificar e quantificar compostos voláteis susceptíveis de provocar defeitos sensoriais em vinhos em contacto com cortiça;
- ii) Pesquisar os compostos padrão estudados em simulantes de vinho que estiveram em contacto com cortiça normal e cortiça com defeitos (bolor e mancha amarela).

Parte I

Introdução

1.1. Cortiça

A cortiça é um tecido vegetal, constituído de células mortas dispostas em parênquima suberificado, originado pelo meristema súbero-felodérmico que constitui o revestimento do tronco e ramos do sobreiro, *Quercus suber* L.. O felogene (tecido merismático com capacidade de divisão celular) tem uma espessura unicelular e gera células de cortiça (felema, ou súber) para o exterior. Para o seu interior o felogene origina um outro tecido, a feloderme (células semelhantes às da madeira), que normalmente é constituída por poucas fiadas de células e é quantitativamente menos significativa. O felema, felogene e a feloderme constituem no seu conjunto a periderme, constituída quase na totalidade pelo súber⁸.

O interesse industrial da cortiça deve-se a um conjunto de características invulgares que este tecido apresenta face a outros materiais naturais. Propriedades, tais como, baixa condutibilidade térmica, relativa impermeabilidade a líquidos e elasticidade, e pelo facto de se tratar de um tecido homogéneo suficientemente espesso que é naturalmente regenerado após cada extracção, tem permitido a sua longa exploração⁹. Actualmente a principal aplicação é como vedante (nos sectores vinícola e automóvel) ou como isolante e decorativo (no sector da construção civil). Em termos económicos, Portugal tem uma posição de liderança mundial em vários domínios¹⁰, nomeadamente:

- na produção de matéria-prima, com a maior taxa de produção por hectare e mais de metade da produção mundial de cortiça em bruto (Tabela 1);
- na produção industrial, com mais 60% do valor da produção de produtos de cortiça transformados;

1.1.1. Produção suberícola

Em termos de produção suberícola, apesar do sobreiro se conseguir desenvolver em várias zonas do mundo, só na região mediterrânica apresenta a capacidade de regeneração de cortiça após sucessivas extracções. A zona de produção de cortiça restringe-se assim a 7 países: Portugal, Espanha, França, Itália, Argélia, Tunísia e Marrocos (Figura 1).

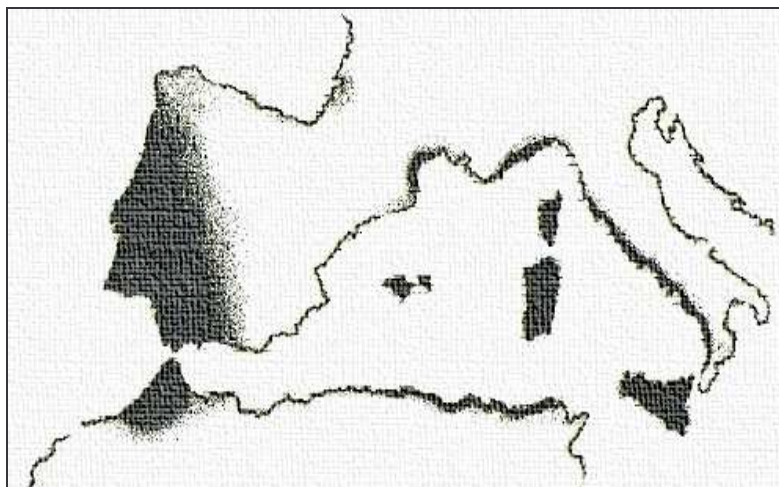


Figura 1. Distribuição actual da área de plantação do sobreiro⁹.

Portugal é o maior produtor suberícola do mundo, verificando-se no ano 2000 uma área de plantação de 730 000 hectares com produção de 185 000 toneladas de cortiça, o que representa mais de 50% de toda a cortiça extraída anualmente (Tabela 1). As condições edafo-climáticas e as técnicas de produção utilizadas permitem que se consiga, em Portugal, a maior taxa de produção mundial por hectare.

Tabela 1. Distribuição da área de plantação de sobreiro e produção de cortiça a nível mundial

País	Área de sobreiro		Produção média anual		Taxa de produção Ton/Ha
	Hectares	%	Toneladas	%	
Portugal	730 000	33	185 000	54	25,3
Espanha	500 000	22	88 000	26	17,6
Argélia	410 000	18	20 000	6	4,9
Marrocos	340 000	15	15 000	4	20,0
França	100 000	4	5 000	1	4,4
Tunísia	99 000	4	9 000	3	9,1
Itália	90 000	4	18 000	5	5,0
Total	2 269 000	100	340 000	100	15,5

Fonte: APCOR dados de 2002.

1.1.2. Caracterização económica da indústria da cortiça em Portugal

A organização do sector industrial da cortiça em Portugal reparte-se em ramos de actividade, com um processo de transformação faseado e classificado nos seguintes sub-sectores:

- **Preparação**, que integra as operações de selecção, cozedura e estabilização e triagem (selecção) da cortiça que, sob a forma de prancha, segue o ciclo de produção como matéria-prima do sub-sector seguinte: a transformação;
- **Transformação**, que visa a elaboração de produtos por simples corte da prancha e onde se inclui a fabricação de rolhas de cortiça natural;
- **Granulação**, com operações de trituração de cortiça de calibre/qualidade inferior e desperdícios resultantes do fabrico natural (apara), produzindo as diferentes matérias-primas para a indústria de aglomerados;
- **Aglomeração**, que corresponde à produção de diferentes tipos de aglomerados conforme envolva ou não produtos estranhos à cortiça.

Como se pode depreender, há uma elevada interdependência entre os diferentes ramos da indústria, uma vez que correspondem a fases sequenciais de transformação de um mesmo material.

Segundo dados do INE, os valores finais para o ano de 2002 indicam um valor total de exportação de 903 milhões de euros, relativos a mais de 138 mil toneladas dos diversos produtos. O sector vinícola é o principal mercado, representando 68% em valor dos produtos fabricados, seja a rolha cortiça natural como a de cortiça aglomerada, com 57% e 11% do valor, respectivamente. Segue-se o sector de matérias de construção civil e o sector da indústria automóvel, com 19% e 11%, respectivamente.

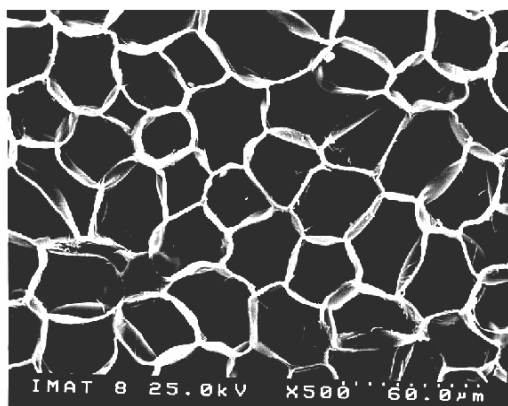
Em termos socio-económicos, é caracterizado pela existência de mais de 900 unidades em todos os ramos sectoriais, localizadas na sua grande maioria no distrito de Aveiro, que representam mais de 10 000 postos de trabalho. O tecido industrial é constituído por micro e pequenas empresas, em que mais de 70% delas têm menos de 20 trabalhadores. Este sector integra um elevado número de unidades certificadas (com sistemas de Gestão da Qualidade: ISO9001, Ambiental: ISO14001, HACCP: Segurança Alimentar:

DS3027 e Systecode¹¹), que utiliza tecnologias de produção avançadas e apresenta sinais de crescentes esforços de investigação e de controlo.

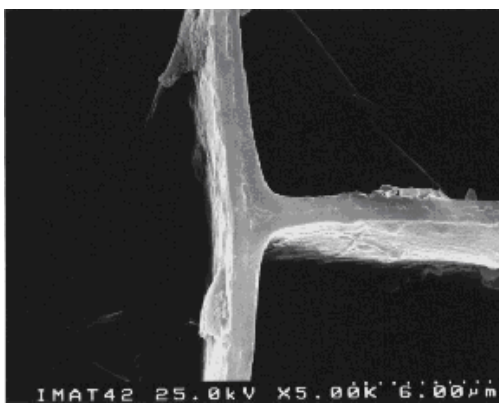
1.1.3. Estrutura celular

Macroscopicamente, a cortiça apresenta uma coloração castanha clara com linhas relativas aos anéis de crescimento anual e canais lenticulares. Trata-se de um material leve e elástico, apresentando como característica ímpar a capacidade de ser comprimido sem expansão lateral.

Microscopicamente é constituída por camadas consecutivas de células mortas de aspecto alveolar (Figura 2). Apresenta uma estrutura regular com células de forma aproximadamente prismática, empilhadas em camadas na direcção radial do tronco da árvore, ligadas entre as bases. Na secção tangencial as células de cortiça apresentam a forma de polígonos com 5, 6 ou 7 faces num arranjo de aparência alveolar em forma de favo de mel¹². A espessura da parede é de 1,1-1,4 μm (Figura 2).



A: ampliação de 500 vezes



B: ampliação de 5000 vezes.

Figura 2. Fotografias de microscopia electrónica de varrimento. Células de cortiça de reprodução. A: corte da secção tangencial, mostrando o arranjo em forma de favo de mel; B: Parede celular de cortiça normal, com espessura 1,1-1,4 μm ¹².

1.1.4. Composição química

A constituição química das paredes celulares da cortiça pode ser dividida em dois tipos de componentes: os componentes estruturais e os componentes não-estruturais. Os

componentes estruturais são macromoléculas de natureza polimérica, que conferem às células a sua forma e grande parte das suas propriedades físico-químicas. A remoção de um dos componentes estruturais só é possível através de ataques químicos ou mecânicos com intensidade suficiente para promover a sua despolimerização parcial e solubilização, alterando as características físico-químicas da cortiça. Os componentes estruturais maioritários da cortiça são a suberina (ca. 40%), lenhina (ca. 20%) e polissacarídeos (ca. 20%)⁸.

Os componentes não estruturais classificam-se em compostos extractáveis e compostos inorgânicos. Os compostos extractáveis podem ser retirados das paredes celulares sem alteração significativa as propriedades mecânicas da cortiça. Representam cerca de 15%, dividindo-se em fracção cerosa e fracção fenólica³. Os componentes inorgânicos são englobados no que geralmente se denomina por cinzas (ca. 1,2%)⁸, ou seja, o resíduo da combustão completa da matéria orgânica, sendo constituídos principalmente por cálcio (60% m/m das cinzas), seguindo-se o fósforo, o sódio, o potássio e o magnésio.

Tem surgido um crescente interesse no estudo e caracterização dos compostos constituintes da cortiça, nomeadamente a suberina^{13,14,15} como fonte de polímeros e por ter actividade anti-mutagénica¹⁶ e os triterpenos, como a betulina, o ácido betulínico e a friedelina, com actividade anti-cancerígena¹⁷.

1.1.4.1. Fracção volátil

A composição volátil da cortiça tem sido pouco estudada. Os primeiros estudos publicados foram baseados em técnicas de extracção e concentração da fracção volátil da cortiça considerada normal usando Freon 113, Chromosorb 101 e Freon 11, seguida de separação e identificação dos compostos por GC/MS¹⁸, tendo sido identificando o α -terpineol, a cânfora, o furfural, a vanilina, o acetato de etilo o *n*-hexanol, o 5-metilfurfural, o ácido butanóico, o 1,2-dimetioxibenzeno, o benzotiazole, o pentanol, o pentanal e o 2-pentilfurano.

Em estudos posteriores procedem à análise da fracção volátil da cortiça recorrendo a técnicas de análise de espaço de cabeça dinâmico com desorção térmica (DHS-TD)¹⁹ e extracção-destilação simultâneas (SDE) pelo método de Lickens-Nickerson modificado²⁰. No primeiro, após se proceder à remoção da camada exterior da rolha de cortiça (cerca de 4 mm de espessura em toda a superfície), estas são trituradas. O pó de cortiça

resultante é submetido a um fluxo de hélio e os compostos voláteis libertados são adsorvidos em Tenax. A remoção no GC é efectuada por um sistema de desorção térmica, tendo sido identificados 90 compostos (Tabela 2). Este método de extracção só permite a remoção dos compostos voláteis. A introdução de artefactos pela degradação térmica do sorbente utilizado é a maior dificuldade desta metodologia, pois a interacção de vapor de água, compostos voláteis e o material sorbente utilizado pode produzir artefactos durante a análise de compostos voláteis²¹.

No segundo estudo procede-se à recolha de pranchas de cortiça consideradas normais (sem cheiros anormais ou defeitos visuais), que são cortadas em pedaços e colocadas no sistema de Lickens-Nickerson modificado, extraídas durante 24 horas com *n*-pentano, sendo o extracto concentrado e analisado por GC/MS, tendo sido identificados 74 compostos (Tabela 2). Esta metodologia apresenta algumas desvantagens: é uma metodologia muito morosa e podem ocorrer artefactos formados por degradação térmica de componentes da cortiça, nomeadamente o furfural e 5-metilfurfural^{20,21,22}.

Os compostos detectados em cada um dos estudos apresentam-se na tabela 2, por classe química, sendo colocados dentro de cada classe por ordem alfabética, indicando a detecção em cada um dos métodos com (+) e não detecção com (-).

Os ácidos carboxílicos alifáticos identificados, unicamente pelo método de DHS-TD, resultam provavelmente da degradação de compostos ácidos da fracção cerosa dos compostos extractáveis da cortiça, composta por ácidos, diácidos e hidroxiácidos gordos, com cadeia longa de C₂₀ a C₂₆. A degradação dos ácidos gordos, seja por auto-oxidação seja por actividade enzimática, resulta no aparecimento de ácidos de cadeia mais curta, seguindo-se a redução aos correspondentes compostos carbonílicos alifáticos, aldeídos e cetonas, álcoois e alcanos e alcenos. Estes ácidos (hexanóico, octanóico e decanóico), apresentam aromas intensos e com descritores de aroma a cera e ranço (Tabela 3). A causa para a não detecção de ácidos voláteis por SDE poderá estar relacionada com o facto de não serem solúveis em *n*-pentano.

A produção de compostos carbonílicos alifáticos, como aldeídos e cetonas, resulta assim da degradação de ácidos gordos (peroxidação lipídica). As ceras e a suberina contêm quantidades de ácidos gordos livres susceptíveis de degradação. Esta degradação pode ocorrer por auto-oxidação dos ácidos gordos ou por actividade enzimática, promovendo a primeira a formação de aldeídos voláteis, caracterizados por apresentarem aromas excepcionalmente fortes, mesmo que presentes em pequenas quantidades, e a segunda

a produção de metilcetonas que em parte são reduzidas aos correspondentes álcoois secundários²⁰.

Os álcoois primários encontrados foram o 1-butanol, o 1-pentanol, o 1-hexanol, o 1-octanol e o 1-dodecanol, cuja origem pode estar na redução de aldeídos alifáticos.

A origem dos hidrocarbonetos alifáticos (maioritariamente alcanos), embora ainda não completamente conhecida, parece resultar de actividade microbiológica, uma vez que cortiça sujeita a condições de actividade microbiológica mais intensa à sua superfície apresenta maiores níveis de alcanos e cicloalcanos³. Verifica-se que os compostos que são comuns nos dois estudos são o *n*-octano, o *n*-undecano e *n*-tridecano. Na classe dos cicloalcanos alifáticos, detectados unicamente por SDE, foram identificados 6 derivados substituídos de ciclo-hexano e 1 biciclo-heptano.

Vários derivados de furanos foram identificados, nomeadamente furfuraldeídos (furfural e 5-metilfurfural), álcool furfurílico e 2-pentilfurano, presentes em grande percentagem relativa em ambos os métodos. A presença destes compostos está normalmente associada à ocorrência de reacções de degradação de açúcares (do tipo reacção de Maillard) provavelmente por acção da temperatura no processo de transformação industrial da cortiça (cozedura, autoclavagem e secagem)²². O seu limite de percepção sensorial é alto sendo por isso fraca a sua contribuição para o aroma da cortiça¹⁹. Os furanos, como o 2-pentilfurano e o acetilfurano, são produtos resultantes da auto-oxidação do ácido linoléico²⁰.

Os principais compostos aromáticos presentes são os alquilbenzenos, sendo a fonte mais provável para o seu aparecimento a degradação da lenhina e da componente polifenólica da suberina, não havendo evidência para ser resultante de actividade microbiológica ou degradação térmica. Os ácidos fenólicos e a lenhina são degradados termicamente ou decompostos por microrganismos resultado assim fenóis: guaiacol, benzaldeído, vanilina e álcool benzílico. Os compostos com estruturas bifenílicas como naftaleno e naftaleno substituído podem estar presentes na cortiça como contaminantes químicos de pela exposição a atmosfera contendo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH's)¹⁹.

Tabela 2. Compostos voláteis identificados em cortiça considerada normal.

Classe química	Composto	Método de extracção	
		DHS-TD ¹⁹	SDE ²⁰
Ácidos alifáticos	Ácido acético	+	-
	Ácido butanóico	+	-
	Ácido 2-etil-hexanóico	+	-
	Ácido heptanóico	+	-
	Ácido hexanóico	+	-
	Ácido 3-metilbutanóico	+	-
	Ácido 2-metilpropanóico	+	-
	Ácido nonanóico	+	-
	Ácido octanóico	+	-
	Ácido pentanóico	+	-
	Ácido propanóico	+	-
Compostos carbonílicos alifáticos	Acetona	+	-
	Butanal	+	-
	2-Butanona	+	-
	2,4-Decadienal	-	+
	Decanal	-	+
	2-Decenal	-	+
	9-Deceno-2-ona	-	+
	2,6-Dimetil-2,6-undecadieno-10-ona	+	-
	6,10-Dimetil-5,9-undecadieno-2-ona	-	+
	2-Dodecanal	+	-
	Heptanal	-	+
	2-Heptanal	-	+
	2-Heptanona	-	+
	Hexanal	+	+
	3-Metilbutanal	+	+
	6-Metil-3,5-heptadieno-2-ona	-	+
	6-Metil-5-hepteno-2-ona	+	+
	2-Metilpentanal	-	+
	3-Metil-2-pentanona	-	+
	2,4-Nonadienal	-	+
	Nonanal	-	+
	2-Nonenal	+	+
	Octanal	+	+
	2-Octenal	-	+
	Pentanal	+	-
	2-Tridecenal	-	+
	2-Undecanona	+	+

Tabela 2 (continuação). Compostos voláteis identificados em cortiça considerada normal.

Classe química	Composto	Método de extracção	
		DHS-TD ¹⁹	SDE ²⁰
Álcoois alifáticos	1-Butanol	+	+
	2-Butoxietanol	+	-
	5,9-Dimetil-9-deceno-3-ol	-	+
	1-Dodecanol	+	-
	2-Etil-1-hexanol	+	-
	1-Hexanol	+	-
	3-Metil-1-butanol	+	+
	1-Octanol	+	+
	1-Pentanol	+	-
	1-Undeceno-4-ol	-	+
Alcanos, alcenos e alcinos	2,3-Dimetil-1,3-butadieno	+	-
	Dimetil-heptano	-	+
	3,5-Dimetil-1,6-octadieno	-	+
	<i>n</i> -Dodecano	+	-
	Etilmetil-hexano	-	+
	3-Etil-2-metil-1,3-hexadieno	-	+
	2-Metil-heptano	-	+
	3-Metil-heptano	-	+
	3-Metiloctano	-	+
	2-Metil-1-penteno	+	-
	Metil-propeno	+	-
	Nonano	-	+
	<i>n</i> -Octano	+	+
	1-Octino	-	+
	<i>n</i> -Tridecano	+	+
	<i>n</i> -Undecano	+	+
Cicloalcanos alifáticos	1,2-Dimetilciclo-hexano	-	+
	1,3-Dimetilciclo-hexano	-	+
	2,2-Dimetil-3-biciclo-heptano	-	+
	Etil-ciclo-hexano	-	+
	1-Etil-2-metilciclo-hexano	-	+
	1-Etil-3-metilciclo-hexano	-	+
	Isopropil-ciclo-hexano	-	+
Furanos	2-Acetilfurano	+	-
	Álcool furfurílico	+	-
	Furfural	+	+
	5-Metilfurfural	+	+
	2-Pentilfurano	+	-

Tabela 2 (continuação). Compostos voláteis identificados em cortiça considerada normal.

Classe química	Composto	Método de extracção	
		DHS-TD ¹⁹	SDE ²⁰
Compostos Aromáticos	Acetofenona (1-feniletanona)	+	+
	Álcool α,α -dimetilbenzílico	+	-
	Álcool benzílico	+	+
	Alcool <i>tert</i> -butilbenzílico	+	-
	Benzaldeído	-	+
	Benzeno	+	-
	3,8-Di-hidroxi-3,4-di-hidronaftaleno-1-ona	-	+
	1,2-Dimetilbenzeno	+	+
	1,3-Dimetilbenzeno	+	+
	1,4-Dimetilbenzeno	+	+
	Dimetilnaftaleno	+	-
	1,2-Dimetoxibenzeno (veratrole)	+	+
	1,3-Dimetoxibenzeno (resorcinol)	-	+
	Etilbenzeno	+	-
	Etil-dimetilbenzeno	+	-
	1-Etil-3-metilbenzeno	+	-
	Fenol	+	+
	2- Hidroxibenzaldeído	+	-
	2-Hidroxi-5-metilacetofenona	-	+
	Isopropilbenzeno	+	-
	4-Metilacetofenona	-	+
	1-Metil-4-isopropilbenzeno	-	+
	3-Metil-isopropilbenzeno	+	-
	1-Metilnaftaleno	+	-
	2-Metilnaftaleno	+	-
	1-Metilvinilbenzeno	+	-
	2-Metoxi-4-metil-1-propilbenzeno	-	+
	4-Metoxifenol (guaiacol)	+	+
	Naftaleno	+	-
	Propilbenzeno	-	+
	1,2,3,4-Tetrametilbenzeno	+	-
	Tolueno	+	+
	1,2,3-Trimetilbenzeno	-	+
	1,2,4-Trimetilbenzeno	+	+
	1,3,5-Trimetilbenzeno	+	+
	Vanilina	-	+
	Vinilbenzeno	+	-
	1-Vinil-2-metilbenzeno	+	-

Tabela 2 (continuação). Compostos voláteis identificados em cortiça considerada normal.

Classe química	Composto	Método de extracção	
		DHS-TD ¹⁹	SDE ²⁰
Terpenóides	Borneol	+	-
	Canfeno	+	+
	Cânfora	+	+
	1,8-Cineole	-	+
	Copaeno	-	+
	Fencol	-	+
	Geranilcetona	+	-
	Geraniol	-	+
	Isoborneol	+	+
	Isopinocanfona	+	-
	Limoneno	+	-
	Linalol	+	-
	α -Ocimeno	+	-
	α -Terpineol	+	+
	1,3,3-Trimetilbicyclo[2.1.1]heptano-2-ol	+	-
Compostos clorados e sulfurados	Benzotiazole	+	+
	Clorobenzeno	+	-
	1,3-Diclorobenzeno	+	-
	Etilisotiocianato	+	-
	1,1,1-Tricloroetano	+	-
	Triclorometano	+	-
Outros	Acetamida	+	-
	Acetato de etilo	+	-
	2-Butoxietanol	-	+
	1,1-Dietoxietano	-	+
	N,N-Dimetilformamida	+	-
	Éter dietílico	+	-
	Tetrametiltiureia	+	-
	2,4,6-Trimetil-1,3,5-trioxano	+	-

Os terpenóides são comuns em plantas, também podendo surgir como metabolitos de microrganismos. Na cortiça foram identificados na fracção dos compostos extractáveis²³. Apresentam um vasto espectro de aromas, sendo a maioria muito agradável¹⁹.

Na classe de compostos clorados e sulfurados foram detectados clorofilinos (2 compostos), 2 clorobenzenos (2 compostos) e compostos sulfurados: o benzotiazole,

comum nos dois métodos, e o etilisotiocianato. Os compostos clorados, detectados unicamente por DHS-TD, com base na informação disponível, não podem ser indicados como tendo causa natural (seja enzimática seja degradação química dos componentes da cortiça) parecendo tratar-se de resíduos de tratamento químico das rolhas analisadas¹⁹. Os compostos sulfurados podem ser metabolitos secundários da degradação microbiológica de aminoácido, nomeadamente metionina²⁴.

Outros compostos identificados são aminas, éteres e ésteres. As aminas, acetamida e N,N-dimetilformamida, podem resultar da reacção de aminoácidos e açúcares redutores, por acção térmica (reacção de Maillard)¹⁹. Na classe dos éteres foram identificados pelo método DHS-TD o éter dietílico e o 2,4,6-trimetil-1,3,5-trioxano. Na classe dos ésteres, unicamente o acetato de etilo foi identificado por DHS-TD.

A maioria dos compostos voláteis identificados apresenta um aroma característico (descritor de aroma- DA) a partir de uma dada concentração (Limite de percepção sensorial-LPS). Assim, o aroma da cortiça normal (N) depende do tipo de compostos voláteis presentes e da sua concentração.

Na Tabela 3 apresentam-se alguns dos compostos voláteis detectados na cortiça considerada normal, agrupados de acordo com a respectiva classe química, o seu descritor aroma e o LPS em água ou vinho.

No sentido de clarificar o significado do “gosto a rolha”, e a afastar desta classificação desvios organolépticos que podem ter uma origem distinta, advir por exemplo, de acidentes de natureza enológica, ou de contaminação da rolha por compostos de aroma nos locais de armazenamento do vinho², e por outro lado normalizar a terminologia utilizada nos descritores de aroma dos resultados obtidos em ensaios de análise sensorial de rolhas de cortiça (após contacto com água ou solução simulante de vinho ou mesmo vinho), foi elaborada uma roda de aromas da cortiça²⁵ (Tabela 4). Esta roda resulta da compilação de resultados de análise sensorial de vinho, efectuada por 2 painéis de provadores treinados. As amostras de vinho foram recolhidas com indicação e confirmação de existência de alterações em relação ao aroma característico do vinho²⁵. O vinho foi acompanhado na sua fase de fabrico para garantir que não apresentava defeitos ao nível de aroma, as alterações observadas deveriam ser associadas exclusivamente à cortiça.

Tabela 3. Compostos voláteis identificados na cortiça e respectivos descritores de aroma e limites de percepção sensorial (LPS).

Classe química	Composto	Descritor de aroma	LPS em vinho ou *água ¹⁹
Terpenóides	Borneol	Pimenta	-
	Isoborneol	Cânfora	-
	Limoneno	Frutado	60 µg/L *
	Linalol	Floral	100 µg/L *
	α-Terpeniol	Floral	280 µg/L *
Álcoois alifáticos	1-Butanol	Farmacêutico	5 mg/L
	1-Hexanol	Herbáceo	5 mg/L
	3-Metil-1-butanol	Whisky, malte	300 mg/L
	1-Octanol	Cera, sabão	-
Ácidos alifáticos	Ácido 3-metilbutanóico	Ranço	700 µg/L
	Ácido octanóico	Cera, farmacêutico	15 mg/L
Compostos aromáticos	Acetofenona	Floral	-
	Álcool benzílico	Frutado	50 mg/L
	Benzaldeído	Amêndoa amarga	3 mg/L
	Guaiacol	Fumado, madeira	20 µg/L
	Vanilina	Baunilha	100 µg/L *
Furanos	Álcool furfurílico	Feno	52 mg/L
	Furfural	Caramelo	65 mg/L
	5-Metilfurfural	Tostado, amêndoa	35 mg/L
Compostos carbonílicos alifáticos	Decanal	Mofo, marinho, pepino	-
	Hexanal	Verde, erva	4,5 mg/L
	2-Nonenal	Metálico, oleoso, gerânio	-
	2-Undecanona	Rosa, citrino	-
Outros	Benzotiazole	Borracha	-

De acordo com a roda de aromas da cortiça, os descritores de aroma foram agrupados em famílias, que por sua vez se reuniram em 5 grupos principais: conífero, vegetal, químico, musgo e bolor (Tabela 4). Estes descritores de aromas podem ser associados a compostos químicos voláteis presentes na cortiça (Tabelas 2 e 3).

Tabela 4. Grupos, famílias e descritores de aroma de acordo com a roda dos aromas da cortiça²⁵.

Grupo	Família	Descritor de aroma
Musgo	Cogumelo fresco	Cogumelo; Trufa
	Húmus	Pútrido/Cogumelos
	Terroso	Cortiça húmida; Terra fresca; Beterraba vermelha; Batata
Químico	Sulfureto	Choco; Pútrido; Pêlo molhado; Lã molhada
	Pirogénico	Alcatrão; Borracha queimada; Cinza
	Fenólico	Farmacêutico; Couro; Fumo
	Hidrocarbonetos	Petróleo; Gasóleo; Gasolina
Vegetal	Madeira	Cortiça fresca; Madeira; Poeira
	Herbáceos	Erva; Feijão verde; Madeira verde
	Balsâmico	Caramelo; Baunilha; Feno
	Especiarias	Aromático; Pimenta; Paprika
Conífero	Agressivo	Cânfora; Eucalipto
	Terpénico	Pinheiro; Resina
Bolor	Bolorento	Bolor; Bafio; Pútrido (frutos); Mofo de cortiça; Mofo de cave

Pode-se assim constatar que o “gosto a rolha” foi decomposto em vários descritores, podendo vários compostos ser considerados como responsáveis pela ocorrência deste defeito no vinho, resultando muitas vezes da acção cumulativa de vários compostos, sendo contudo o mais fortemente associado, e pelo seu baixo limite de percepção

sensorial (4 ng/L) o 2,4,6-tricloroanisole. A concentração necessária de cada compostos volátil, ou mesmo a concentração resultante da acção sinérgica de diferentes compostos, necessária para induzir defeito num vinho depende ainda das próprias características deste último, como o tempo de envelhecimento, o teor em álcool e as castas de uvas intervenientes².

Uma vez que uma grande maioria dos compostos voláteis de aroma identificados na cortiça (Tabelas 2 e 3) resulta de actividade microbiológica ou degradação térmica, a cortiça pode apresentar perfis de aromas que são dependentes das características de processamento industrial e dos ataques microbiológicos sofridos.

1.1.5. Ataques microbiológicos

A cortiça é um produto natural susceptível de sofrer ataques microbiológicos, desde a floresta, durante o processamento industrial, até à fase de engarrafamento. Estes ataques podem conduzir a alterações na sua composição química e consequentemente nas suas propriedades mecânicas, aspecto visual e odor.

Em 1990¹ surgem as primeiras referências a defeitos em vinhos associados a metabolitos secundários provenientes da cortiça. Os bolores do género *Streptomyces*, *Aspergillus* e *Penicillium*, que se podem desenvolvem à superfície das rolhas de cortiça, podem provocar a degradação química dos seus constituintes e originar a formação de metabolitos secundários susceptíveis de provocar defeitos ao nível sensorial. Os mais estudados têm sido o guaiacol²⁶ e alguns compostos organoclorados, tais como o 2,4,6-tricloroanisole²⁷. Muitos outros compostos têm sido referidos como resultantes da actividade de fungos sobre alimentos, tais como 2-metilisoborneol, geosmina, 1-octeno-3-ol, 1-octeno-3-ona e metilcetonas²⁴.

A microflora da cortiça, bem como do ambiente fabril, ao longo do processo de transformação tem vindo a ser objecto de vários estudos^{28,29}. Verifica-se que a cortiça é um meio muito complexo, que pode suportar o desenvolvimento de grandes e variadas populações de microrganismos sendo os bolores os mais frequentes, seguindo-se as bactérias e por fim as leveduras²⁶. Estes podem-se encontrar nas lenticelas, desenvolvendo-se à superfície do tecido suberoso quando as condições de temperatura e humidade forem favoráveis.

Dentro das situações de ataques microbiológicos consideram-se duas particularmente relevantes, dadas as consequências nefastas que daí podem advir: cortiça contaminada com bolor (B) e cortiça com mancha amarela (MA). Estes tipos de cortiça apresentam composição química distinta (Tabela 5).

Tabela 5. Composição química de cortiça normal (N), bolor (B) e mancha amarela (MA)³.

Parâmetro	% (m/m)		
	Cortiça normal (N)	Cortiça bolor ^{a)} (B)	Cortiça mancha amarela (MA)
Suberina	37,3	40,2	38,0
Lenhina	22,9	22,8	20,0
Polissacarídeos	25,9	19,4	20,4
Açúcares livres ²⁰	1,43	0,26	1,13
Extractáveis	13,4	11,5	17,0
Diclorometano	7,3	6,3	6,6
Etanol	4,0	3,5	4,7
Água	2,1	1,7	5,7
Substâncias pécicas ¹²	1,5	-	0,5
Extractáveis em solução etanol/água (12%)	2,9	2,1	5,5

a) Pranchas de cortiça colocadas em lugar húmido, durante 2 meses.

Apesar de ser uma área pouco estudada, verifica-se que a diferença entre a cortiça N e B se situa mais ao nível dos polissacarídeos, açúcares livres e compostos extractáveis, com alterações ao nível da fracção volátil, enquanto que em relação à cortiça MA, além das alterações ao mesmo nível se verificam ainda indícios de alterações suplementares ao nível da lenhina. Este facto é responsável pela alteração da estrutura celular observada para a cortiça MA (ponto 1.1.5.2.).

1.1.5.1. Cortiça contaminada com bolores

O crescimento dos bolores nas pranchas de cortiça pode causar diferenças significativas no seu aroma, dependendo das espécies que se desenvolvem, pois diferentes espécies levam à produção de diferentes metabolitos secundários²⁰.

A análise comparativa de placas de cortiça recolhida em condições normais de fabrico e outras colocadas durante dois meses em local húmido promovendo assim o crescimento de bolores, conclui que a actividade dos bolores sobre a cortiça é acentuada ao nível dos polissacarídeos e de uma fracção dos compostos extractáveis, principalmente nos polifenólicos^{3, 20}.

A fracção volátil da cortiça contaminada altera-se, apresentando uma menor quantidade de aldeídos alifáticos e, pelo contrário, uma maior quantidade de álcoois alifáticos, nomeadamente: o 1-butanol, o 3-metil-1-butanol, o 1-pentanol e o 1-undeceno-4-ol. Isto ocorre por acção de dehidrogenases, reduzindo os aldeídos derivados dos ácidos gordos aos álcoois correspondentes.

Este tipo de cortiça apresenta igualmente uma maior proporção de hidrocarbonetos alifáticos, sendo notório o incremento em metilalcanos, nomeadamente o 2-metil-heptano, o 3-metil-heptano, o 3-metiloctano, e, igualmente, uma maior proporção de terpenóides, sendo formado o 2-metilisoborneol, que apresenta aroma desagradável a terra/mofo²⁰.

O aparecimento de compostos aromáticos clorados, nomeadamente o 1,4-diclorobenzeno e o 2,4,6-tricloroanisole (TCA), parece ter origem na metilação microbiológica de clorofenóis^{25,30,31,36}, cuja presença poderá igualmente estar associada a actividade microbiológica, uma vez que existem referências para a biogénese de compostos aromáticos clorados em ambientes naturais³².

Os compostos organoclorados pertencem ao mais importante grupo de poluentes prioritários da agência americana de protecção ambiental (EPA), tendo a União Europeia estabelecido já limites para a concentração destes analitos em água destinada ao consumo humano. A sua presença em cortiça pode ter diferentes origens, incluindo o uso de fungicidas, herbicidas, preservantes de madeira ou produtos de lavagem contendo 2,4,6-triclorofenol, 2,3,4,6-tetraclorofenol e pentaclorofenol, seja no ambiente de desenvolvimento do sobreiro seja por contaminação durante o processo de transformação.

Estudos anteriores^{25,33} efectuados em pranchas de cortiça concluíram que, apesar dos níveis se encontrarem abaixo do LPS, a presença de TCA resulta de uma contaminação ambiental externa durante o período de crescimento da cortiça (9 anos), uma vez que as quantidades detectadas na região junto ao solo e na parte exterior da prancha foram significativamente maiores do que nas partes superiores da árvore e na parte junto ao tronco.

A identificação dos compostos formados por cada uma das espécies que fazem parte da microflora da cortiça ou quais as espécies que produzem determinado compostos químico, têm sido as duas formas de abordagem dos efeitos da actividade microbiológica sobre a cortiça. No primeiro pode-se referir o isolamento de 10 espécies de microrganismos dos géneros: *Penicillium* (3 estirpes), *Trichoderma* (2 estirpes), *Aspergillus* (2 estirpes), *Mucor*, *Monillia* e *Streptomyces* (1 estirpe de cada) de pranchas de cortiça sem qualquer processamento industrial, que foram cultivados num meio de cultura de extracto de malte e outro com pó de cortiça esterilizado, sendo os compostos voláteis produzidos analisados por DHS-TD, sendo identificados por GC-MS³⁴. Os compostos voláteis produzidos por crescimento das estirpes em cortiça foram: sesquiterpenos (α -santaleno, cariofileno, α e β -bergamoteno, isocariofileno, β -bisaboleno e α -curcumeno) com aromas balsâmico, floral ou frutado, anisole, compostos aromáticos clorados (clorobenzeno e 1,3-diclorobenzeno), 1-octeno-3-ol, com aroma a cogumelos, e 3-octanona, que apresenta descritores de aroma: floral, verde, frutado e a mofo.

Em relação a compostos químicos específicos produzidos pela microflora da cortiça, os estudos têm sido orientados para a produção de TCA^{27,30} e guaiacol²⁶.

Em termos de estrutura celular, e por análise por microscopia electrónica de varrimento, não se verificam diferenças entre células de cortiça N e cortiça B, seja ao nível da degradação por bolores das lamelas da parede celular seja na alteração da sua espessura¹².

1.1.5.2. Cortiça classificada como mancha amarela

O ataque por fungos, como a *Armillaria mellea*, provoca na cortiça alterações químicas e físicas, e consequentemente modificações nas suas propriedades mecânicas e características visuais. Este tipo de cortiça pode estar na origem do aparecimento de aromas indesejáveis em vinho em contacto com esta cortiça. A *A.mellea* pode

desenvolver-se nos solos das florestas e actua como parasita em plantas vivas e como saprófita em tecido mortos. Como parasita, este fungo causa a redução do crescimento, a decrepitude e fragilização, predispondo-as para o ataque por outros fungos e insectos, podendo mesmo provocar a sua morte. Como saprófita, é o microrganismo presente na podridão branca dos troncos e cascas. Na cortiça, após uma fase inicial em que se desenvolve um micélio de cor branca, começa a aparecer zonas com coloração amarela, e que se verifica principalmente na produção de cortiça do Norte de África^{2,20,35}. A cortiça com desenvolvimento de coloração amarelada é industrialmente separada e classificada como defeituosa, com mancha amarela¹¹.

Estudos sobre cortiça com sinais evidentes de mancha amarela (MA)^{3,20} indicam a presença de maior quantidade de terpenóides do que as registadas em cortiça N. Verificou-se igualmente um incremento dos teores de benzaldeído, álcool benzílico, 2-hidroximetil-acetofenona e vanilina na cortiça MA, o que deverá estar associado à degradação da fracção fenólica da cortiça. Neste tipo de cortiça foram igualmente identificados compostos organoclorados, nomeadamente o TCA²⁰.

A cortiça MA apresenta um aroma diferente da cortiça N. Quando seca apresenta um aroma adocicado que deverá estar relacionado com os compostos fenólicos voláteis, quando húmida tem um aroma a bolor, podendo neste caso revelar os descritores de aroma associados ao TCA. Esta cortiça apresenta uma estrutura celular heterogénea, apresentando zonas com estrutura celular irregular. Na zona das manchas, as células tornam-se enrugadas, apresentando separação ao nível da lamela média, com diminuição da espessura da parede celular (0,6-0,9 µm de espessura)¹². Estes efeitos devem-se ao facto dos fungos solubilizarem e removerem a fracção péctica de polissacarídeos da lamela média e atacarem a lenhina.

1.1.6. Influência da cortiça sobre as características organolépticas do vinho

A aplicação mais comum da rolha de cortiça é a vedação de vinho. A rolha é completamente introduzida no gargalo de garrafas de vidro, que são de seguida deitadas ou invertidas, estando assim o vinho em contacto com a cortiça. A sua utilização remonta a épocas anteriores ao nascimento de Cristo mantendo-se ainda actualmente como o vedante de eleição, especialmente para vinhos de qualidade e aqueles que vão estar em

garrafa durante períodos longos³⁶, que por vezes podem chegar aos 30 anos, e até mais. Em todo o mundo são anualmente vendidas 12 a 13 mil milhões de garrafas de vinho com rolha de cortiça¹⁹.

As características de teor em álcool, tipicamente entre 8 e 13%, e de acidez, com pH entre 3,2 e 4, tornam o vinho uma solução de extracção, ocorrendo a migração de compostos da cortiça para o vinho. Utilizando uma solução etanol/água a 12 %, os compostos extractáveis de cortiça normal (N) representam um valor da ordem dos 2,9% m/m (Tabela 5), podendo ser solubilizados compostos aromáticos derivados de substâncias fenólicas, açúcares livres, triterpenos, *n*-alcanos, *n*-alcoóis e ácidos gordos. Estudos de migração efectuados em vinho^{37,38} indicam que os compostos voláteis que podem migrar de cortiça normal para vinho pertencem ao grupo dos álcoois (o 2-butoxietanol, o 4-vinilguaiacol, o guaiacol, 2-feniletílico, álcool benzílico, carbitol, 2-fenoxietanol e butilcarbitol), dos terpenóides (α -terpineol e linalol) ácidos (com um número de átomos de carbono entre C₆ e C₉) e compostos carbonílicos (furfural, 5-metilfurfural, benzaldeído, vanilina, acetovanilona, etilvanilina e cânfora).

Por outro lado, uma das características da cortiça é apresentar alguma permeabilidade ao vapor de água e a outras moléculas em estado de vapor. Assim, os compostos voláteis, sejam metabolitos sejam contaminantes ambientais, penetram através dos “buracos da estrutura celular” e são adsorvidos pela superfície interna da cortiça, reduzindo assim a sua pressão de vapor. A sua posterior difusão da cortiça para o vinho está condicionada pela pressão de vapor dos compostos adsorvidos. Ao ser introduzida no gargalo da garrafa, a rolha sofre uma compressão, que irá aumentar a pressão das substâncias gasosas dentro das células. Por outro lado, as moléculas de água ou etanol que penetram na rolha vão competir com os compostos voláteis para os mesmos locais de adsorção, favorecendo a sua passagem para o exterior. Assim, a difusão de compostos voláteis para o exterior continuará até que as suas actividades no interior da cortiça e no vinho, sejam as mesmas³.

Os compostos voláteis podem ser formados na cortiça ou adsorvidos durante o período de tempo em que a cortiça é processada, fica armazenada ou está em contacto com o vinho, podendo ocorrer alterações que podem levar ao aparecimento de problemas que vão influenciar a composição química da cortiça e, em consequência as características organolépticas do vinho.

Uma destas alterações é a ocorrência de uma falha na vedação, quer seja causada por problemas de processamento da cortiça, quer pela existência de defeitos estruturais ou erros de engarrafamento, que leva à introdução anómala de ar no interior da garrafa com consequentes fenómenos de oxidação do vinho. Estes problemas podem ainda levar à saída de vinho do interior da garrafa e sua deposição no topo exterior da rolha, criando um substrato favorável ao ataque por bolores, quando as condições ambiente (humidade e temperatura) forem favoráveis, com a consequente degradação de compostos e aparecimento de compostos de aroma anómalo. Outra deve-se ao facto da cortiça poder estar sujeita ao ataque por microrganismos durante o processamento industrial: cortiça B e cortiça MA, levando à alteração da sua composição química normal, especialmente na fracção de compostos voláteis e compostos extractáveis (Tabela 5), com evidências de alteração organoléptica de vinhos³. A cortiça MA é industrialmente considerada de elevado risco e eliminada durante o processamento industrial¹¹.

Desde que foi estabelecida uma ligação entre o aparecimento de gostos estranhos em bebidas e o TCA³⁹ que este tem sido referido como sendo o grande e único problema, como metabolito secundário de acção de microrganismos aparecendo como contaminante em diversos materiais, alimentos e bebidas, incluindo água de consumo⁴⁰.

Ao longo do tempo, um número limitado de outros compostos (Figura 3) tem vindo a ser associado em casos de vinho identificados com problemas de “gostos estranhos”^{26,41} sendo o guaiacol, a geosmina, o 1-octeno-3-ol, a 1-octeno-3-ona, o 2-metilisoborneol e, mais recentemente derivados de metoxipirazina⁴², nomeadamente a 2-isopropil-3-metoxipirazina, 2-isobutil-3-metoxipirazina, 2,5-dimetil-3-metoxipirazina⁴³, e ainda o 2,4,6-tribromoanisole⁴⁴. O tipo de aromas apresentado (mofo, terra, bolor) leva a concluir que a sua origem está relacionada com actividade fúngica, nomeadamente o 1-octeno-3-ol, o metilisoborneol e a geosmina²⁴. O guaiacol é um composto formado a partir da degradação microbiológica da vanilina por microrganismos normalmente encontrados na microflora da cortiça²⁶. As pirazinas são compostos igualmente referidos como causadores de aromas indesejáveis em vinhos, surgindo devido a problemas de vinificação⁴². O 2,4,6-tribromoanisole surge como potencial causa para o aparecimento de aromas a mofo em vinhos, mas com uma provável origem relacionada com a contaminação ambiental dos locais de armazenamento de garrafas de vinho⁴⁴.

Como se pode verificar na Figura 3, os limites de percepção sensorial dos compostos referidos são muito baixos (de 2 ng/L a 20 µg/L), o que leva a que as correspondentes metodologias analíticas necessitem de ter sensibilidade adequada à quantificação destes compostos em tão baixos níveis.

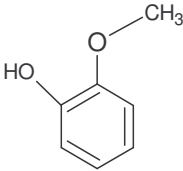
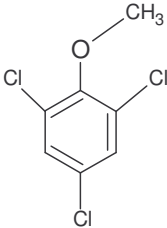
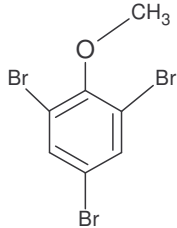
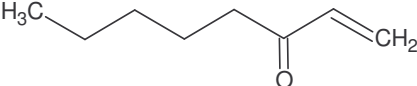
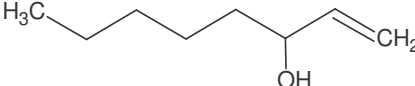
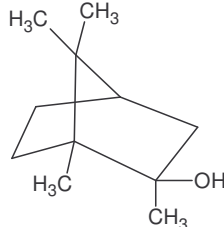
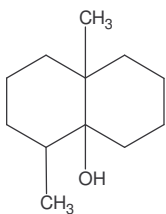
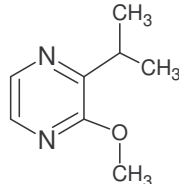
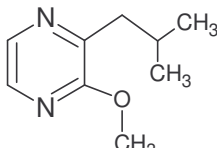
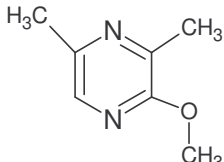
		
Guaiacol DA: fumado, madeira LPS: 20 µg/L	2,4,6-Tricloroanisole DA: mofo LPS: 4 ng/L	2,4,6-Tribromoanisole DA: mofo LPS: 4 ng/L
<hr/>		
		
1-Octeno-3-ona DA: cogumelos LPS:	1-Octeno-3-ol DA: cogumelos LPS: 20 µg/L	
<hr/>		
		
2-Metilisoborneol DA: terra, mofo, bolor LPS: 30 ng/L	Geosmina DA: terra, mofo LPS: 25 ng/L	
<hr/>		
		
2-Isopropil-3-metoxipirazina DA: terra, vegetal, batata LPS: 2 ng/L	2-Isobutil-3-metoxipirazina DA: vegetal, pimenta verde LPS: 2 ng/L	2,5-dimetil-3-metoxipirazina DA: bolor, mofo LPS: 2 ng/L

Figura 3. Compostos químicos susceptíveis de provocar defeitos em vinhos, associados à cortiça. DA: Descritor de aroma; LPS: Limite de percepção sensorial.

1.2. Micro-extracção em fase sólida

A micro-extracção em fase sólida (SPME) foi introduzida no final dos anos 80 para análise de poluentes em água⁴⁵. Apresentou-se como uma alternativa aos métodos tradicionais de extracção em espaço de cabeça dinâmico, extracção líquido-líquido e outras técnicas de extracção⁴⁶. Trata-se de uma técnica de extracção e pré-concentração simultânea de compostos voláteis e semi-voláteis, sem solvente. Envolve a exposição de uma fase estacionária à amostra e a partição dos analitos entre fases. Posteriormente são termicamente desorvidos no injector de um instrumento analítico, como por exemplo um cromatógrafo. A tendência actual de evolução da técnica é o desenvolvimento de fases estacionárias altamente selectivas e novas metodologias de micro-extracção capilar em sol-gel (sol-gelCME: capillary microextraction) que permitem atingir limites de detecção de partes por quadrilhão (pg/L), por cromatografia com detector de ionização de chama⁴⁷.

1.2.1. Fundamentos teóricos

O modelo de fundamentação teórica da extracção dos analitos por SPME depende do processo de sorção envolvido. No caso de se tratar de uma fase estacionária líquida (extracção por absorção), o princípio base é a partição do analito entre fases⁶. No caso de revestimentos sólidos (por adsorção) o modelo é baseado na isotérmica de adsorção de Langmuir⁴⁸.

A técnica de SPME pode funcionar segundo um sistema de 2 fases⁶ (amostra - fase estacionária) ou 3 fases⁷ (amostra - espaço de cabeça - fase estacionária), como esquematizado na Figura 4. A fase estacionária é colocada em contacto com a matriz da amostra durante um determinado tempo e sob condições específicas. Se o tempo for suficiente ocorre o equilíbrio entre a fase estacionária e a amostra, no caso de um sistema de 2 fases, ou entre a fase estacionária, a região de espaço de cabeça e a amostra, no caso de um sistema com 3 fases. Assim, a quantidade de analito sorvida na fase estacionária, pode ser relacionada com a concentração de equilíbrio dos analitos nas fases do sistema.

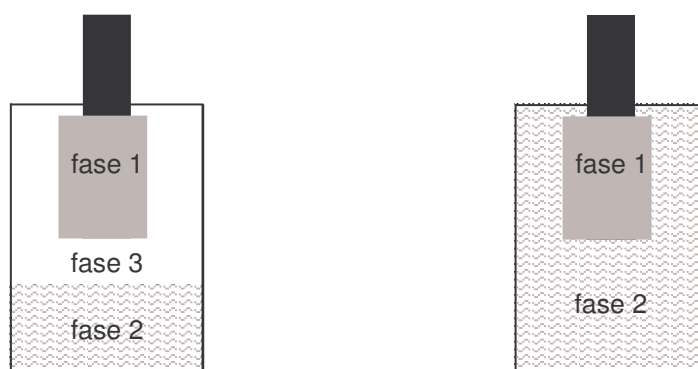


Figura 4. Sistemas de extração por SPME com 3 fases e 2 fases. Fase 1: fase estacionária de SPME, fase 2: amostra sólida ou líquida, fase 3: região de espaço de cabeça.

Considerando um sistema de três fases, no equilíbrio, a quantidade total de analito acumulada na fase estacionária é igual à quantidade de analito em equilíbrio nas três fases:

$$C_0 V_2 = C_1^\infty V_1 + C_2^\infty V_2 + C_3^\infty V_3 \quad (\text{eq.1})$$

em que C_0 é a concentração inicial de analito na amostra, C_1^∞ , C_2^∞ , C_3^∞ são a concentração de equilíbrio do analito na fase estacionária, amostra e espaço de cabeça, respectivamente, e V_1 , V_2 , V_3 o volume de fase estacionária, solução amostra e espaço de cabeça, respectivamente. Utilizando o conceito de coeficiente de partição entre fase estacionária - espaço de cabeça, $K_1 = C_1^\infty / C_3^\infty$, e entre espaço de cabeça - solução aquosa $K_2 = C_3^\infty / C_2^\infty$, a quantidade de analito acumulada pela fase estacionária, denominada capacidade do revestimento, $n = C_1^\infty V_1$, pode ser expressa como:

$$n = \frac{K_1 K_2 V_1 V_2}{K_1 K_2 V_1 + K_2 V_3 + V_2} C_0 \quad (\text{eq.2})$$

Assim, dependendo dos coeficientes de partição entre as fases e dos volumes de cada fase, pode ser traçada uma relação de proporcionalidade entre a concentração inicial do analito na amostra e a quantidade de equilíbrio do analito acumulada na fase estacionária.

No caso de um sistema de 2 fases, no equilíbrio, a quantidade total de analito acumulada na fase estacionária é igual à quantidade de analito em equilíbrio nas duas fases:

$$n = \frac{KV_1V_2}{KV_1 + V_2} C_0 \quad (\text{eq.3})$$

Sendo K o coeficiente de partição entre a fase estacionária e a amostra, podemos estabelecer uma relação entre K e a constante de Henry do analito na fase estacionária K_F e na solução aquosa K_H .

$$K = K_1 K_2 = \frac{K_H}{K_F} \quad (\text{eq.4})$$

A equação 3 descreve a massa sorvida após o sistema ter atingido o equilíbrio. Na maioria das determinações analíticas o coeficiente de partição entre a fase estacionária e a amostra, K, é relativamente pequeno quando comparado com razão entre os volumes da amostra e de revestimento ($V_1 \ll V_2$), resultando assim numa relação linear muito simples (eq.5) não sendo necessário que a amostra tenha um volume exactamente definido, uma vez que a quantidade de analito extraída é independente do volume da amostra ($KV_1 \ll V_2$).

$$n = KV_1 C_0 \quad (\text{eq.5})$$

Se, pelo contrário, o coeficiente de partição for muito grande, o termo KV_1 , será muito maior que V_2 ($KV_1 \gg V_2$) ficando então $n = V_2 C_0$, o que indica que o analito é totalmente extraído pela fase estacionária.

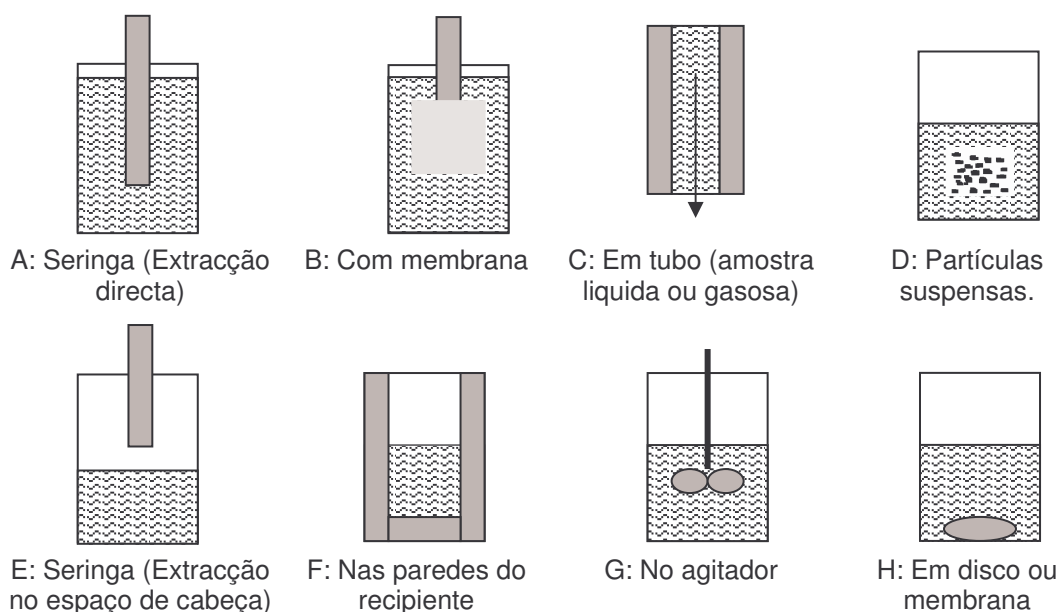
A extracção pode ser interrompida e a fase estacionária analisada antes do equilíbrio. No entanto, para se obterem dados com reprodutibilidade, devem ser mantidas as condições de realização do ensaio, especialmente a agitação e o tempo de extracção.

1.2.2. Dispositivos de extracção

O dispositivo de SPME mais utilizado pode ser descrito esquematicamente como uma seringa com agulha e septo e êmbolo exteriores⁴⁶. A agulha encerra um suporte de sílica fundida revestido com a fase estacionária polimérica. Este suporte pode então ser

introduzido na matriz líquida da amostra - extracção directa, ou na fase gasosa acima da amostra – *headspace* – região de espaço de cabeça, podendo neste caso tratar-se de uma matriz de amostra líquida ou sólida.

Outras configurações foram sendo desenvolvidas (Figura 5): a fase estacionária pode ser colocada nas paredes do recipiente ou num tubo por onde a amostra é passada (C e F), na forma de partículas suspensas na solução (D), como revestimento de um agitador (G) ou sob a forma de disco ou membrana (H). Caso a matriz da amostra apresente características muito adversas pode ser protegida com a utilização de uma membrana porosa que impeça o contacto de substâncias sem interesse com a fase estacionária (B).



1.2.3. Modos de extracção

A selecção do modo de extracção, directa ou em espaço de cabeça (HS-SPME), deve ser feita em função da volatilidade do analito e solubilidade ou afinidade dos compostos para a fase orgânica⁶. No caso de analitos semi-voláteis (pressão de vapor > 10^{-7} mm Hg a 25°C), normalmente é aconselhável que a fase estacionária seja imersa na solução da amostra⁴⁹.

No caso de valores de elevada partição entre a fase líquida e a fase gasosa (constante de Henry > 90 atm.cm³/mol) e solubilidade em solventes orgânicos (logaritmo do coeficiente de partição octanol/água < 4), a extracção deve ser efectuada na região de espaço de cabeça. A superfície de interface entre a matriz líquida e a fase gasosa é grande e os coeficientes de difusão de compostos na região de espaço de cabeça são maiores do que num sistema de duas fases, tipicamente por um incremento superior a 4 ordens de grandeza⁷.

A extracção na região de espaço de cabeça apresenta vantagens em relação à protecção da fase estacionária de efeitos adversos causados por compostos não voláteis de peso molecular elevado existentes na matriz da amostra, conferindo maior durabilidade na utilização e ainda a possibilidade de se proceder ao ajuste das condições de extracção da amostra (pH, força eluotrópica, força iónica) sem causar efeitos nefastos na fase estacionária.

As fases estacionárias encontram-se comercialmente disponíveis em suporte de sílica fundida com comprimento de 1 ou 2 cm. A sua selecção deve ser efectuada de forma a haver uma forte afinidade para os compostos que se pretende extrair.

Comercialmente, classificam-se de acordo com o mecanismo de extracção (absorção ou adsorção), e a polaridade: podendo ser polares, apolares ou bipolares (Tabela 6.).

Tabela 6. Fases estacionárias comercialmente disponíveis por tipos (Supelco, Inc).

Tipo	Polaridade	Fase estacionária
Absorventes	Apolares	PDMS: Polidimetilsiloxano
	Polares	PA: Poliacrilato
Adsorventes	Bi polares	DVB/PDMS: Divinilbenzeno em polidimetilsiloxano
		CAR/PDMS: Carboxen em polidimetilsiloxano
		DVB/CAR/PDMS: Divinilbenzeno/Carboxen™ em polidimetilsiloxano
	Polares	CW/DVB: Divinilbenzeno em Carbowax®

Implicitamente à escolha da fase estacionária adequada para o analito está um processo de sorção⁶: adsorvente ou absorvente.

As fibras do tipo absorvente extraem por partição do analito na fase estacionária líquida, por vezes como efeito de uma esponja (Figura 6A). Os analitos migram para dentro e para fora do revestimento sendo a capacidade de retenção e libertação do analito dependente da sua espessura e tamanho do analito⁴⁹.

Regra geral, quanto maior for a espessura maior será a capacidade de absorção da fibra. As propriedades de extracção da fase estacionária não se alteram substancialmente até que a quantidade extraída seja aproximadamente cerca de 1% da massa de fase estacionária, pelo que, a temperatura constante, a relação entre concentração da amostra e massa extraída é linear numa grande gama de concentração de analitos e interferentes, sendo cerca de 4 ordens de grandeza superior ao tipo adsorvente. Esta característica torna este tipo de fase estacionária aconselhável para a análise de analitos de pequena dimensão e em gamas de concentração esperada com grande amplitude, desde algumas partes por milhão a alguns pontos percentuais.

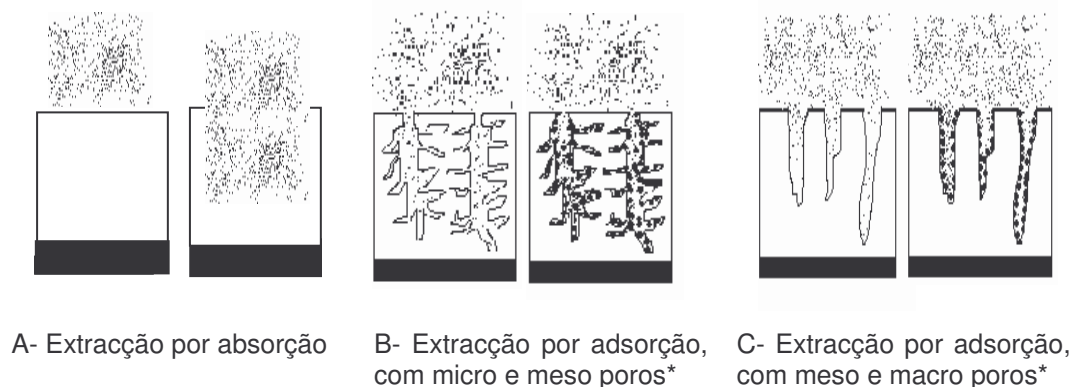


Figura 6. Representação esquemática de um corte de uma fibra de SPME durante o processo de extracção, usando fibras do tipo absorvente (A) e adsorvente (B e C)⁴⁸.

* Micro-poros (2-20Å), meso-poros (20-500 Å) e macro-poros (> 500Å).

No caso de utilização de polímeros sólidos como fase estacionária, as interacções que representam o papel mais importante são intermoleculares e fracas (e interacções hidrofóbicas quando a extracção é efectuada a partir de matriz aquosa)⁴⁸, ocorrendo a extracção por um mecanismo do tipo adsorvente. O número de sítios superficiais onde a adsorção ocorre é limitado, pelo que quando todos são ocupados nenhum analito pode posteriormente ser captado (Figura 6). Desta forma, a relação entre a concentração de

analito extraído de uma amostra por um revestimento sólido pode não ser linear numa gama alargada de concentrações. A sua vantagem em relação às de absorção é a elevada selectividade e capacidade para compostos polares e compostos voláteis^{48,49,50}.

1.2.4. Fases estacionárias

A sensibilidade é melhorada por uma rigorosa selecção do tipo de fase estacionária (Tabela 7) e modo de extracção (directa ou em espaço de cabeça). No caso de analitos voláteis e semi-voláteis não polares deverá sempre optar-se por análise em espaço de cabeça pois, além dos analitos se poderem difundir mais rapidamente, conseguem eliminar-se interferências de matriz e uma maior durabilidade dos dispositivos de extracção. Para compostos semi-voláteis, a relação de polaridade com a fase estacionária é crítica.

Tabela 7. Fases estacionárias SPME comercialmente disponíveis para GC (de Supelco, Inc, Bellefonte, PA, EUA).

Fase estacionária	Espessura do filme (µm)	Uso recomendado
PDMS	100	Compostos voláteis.
	30	Compostos semi-voláteis não polares.
	7	Compostos não polares ou moderadamente polares com elevado peso molecular.
PDMS/DVB	65	Compostos voláteis polares, aminas e nitroaminas.
PA	85	Compostos semi-voláteis polares.
CAR/PDMS	75	Gases e compostos de baixo peso molecular, em quantidades vestigiais.
	85	Compostos de natureza bipolar.
CW/DVB	65	Álcoois e compostos polares.
	65	Compostos moderadamente polares.
DVB/CAR/PDMS	50/30	Aromas (compostos voláteis e semi-voláteis).

Assim, para se desenvolverem metodologias de SPME é importante conhecer as características físico-químicas dos analitos (como a polaridade, grupos funcionais, pressão de vapor, estrutura e massa molecular) e os efeitos de matriz.

Para assegurar níveis adequados de reprodutibilidade, é importante manter fixos os parâmetros experimentais que influenciam a extracção do analito.

1.2.5. Influência das condições experimentais

1.2.5.1. Na extracção

Estimando a influência dos parâmetros que afectam a termodinâmica do processo de extracção, podemos otimizar os parâmetros e, assim, controlar a sensibilidade e reprodutibilidade da técnica. Conceitos teóricos podem ser usados para otimizar as condições de extracção, permitindo igualmente a sua correcção. Os parâmetros que afectam a constante de distribuição são o pH, a temperatura de extracção, a força iónica, a força eluotrópica, a agitação e a razão β (volume de espaço de cabeça/volume de amostra). O tempo para atingir o equilíbrio é afectado igualmente pela constante de distribuição e ainda pela agitação, pela espessura da fase estacionária e pela forma como o suporte é colocado na amostra (imerso ou na região de espaço de cabeça).

À semelhança do que se verifica na extracção líquido-líquido, para garantir que, pelo menos 99% da forma neutra de um composto é extraída, o pH da solução deve ser ajustado a, pelo menos, 2 unidades inferior ou superior ao pKa do analito, caso se trate de um ácido ou de uma base, respectivamente⁶. Mais importante é o ajuste e controlo do pH de forma a manter-se constante em todas as amostras em análise.

O efeito da temperatura sobre a área cromatográfica dos compostos presentes na matriz está relacionado com 3 factores. Por um lado, e uma vez que o processo de absorção dos compostos pela fase estacionária é exotérmico, o aumento da temperatura provoca a difusão das moléculas de compostos absorvidas pela fase estacionária para a fase gasosa, o que contribui para a redução do coeficiente de partição fase estacionária/fase gasosa (k_1). Por outro lado, o aumento da temperatura também aumenta a solubilidade dos compostos na matriz o que causa uma redução no coeficiente de partição fase gasosa/fase líquida (K_2). Por outro lado o aumento de temperatura pode levar a um aumento da volatilidade dos compostos presentes na matriz, o que contribui para o

aumento do coeficiente de partição fase gasosa/fase líquida (K_2)⁵¹. O equilíbrio entre os diversos factores faz com que prevaleça um deles, contribuindo assim para um efeito positivo ou negativo sobre a quantidade de composto extraída.

Em relação à força iónica, e de um modo geral, a presença de um electrólito pode influenciar o processo de extracção de duas formas, alterando as propriedades de interface situada na fronteira entre a fase líquida e o espaço de cabeça e pela diminuição da solubilidade dos compostos hidrofóbicos na fase aquosa, promovendo a deslocação do equilíbrio da fase aquosa (amostra) no sentido da fase de espaço de cabeça ou para a fase estacionária do suporte SPME⁷. Normalmente, os compostos voláteis polares em matrizes polares (amostras aquosas) sentirão maiores efeitos no coeficiente de partição após adição de sal à amostra.

A alteração da força eluotrópica resulta da existência de solventes orgânicos na matriz aquosa da amostra, como etanol. Estes provocam uma alteração significativa na força eluotrópica da solução⁶, funcionando como co-solventes relativamente às fases estacionárias de SPME. Variações da ordem de 0,5% do volume causam uma redução significativa (mais de 60%), na recuperação de compostos polares semi-voláteis⁵², pelo que ao analisar compostos em matrizes alcoólicas, como vinhos, deve ser tido especial cuidado com o teor em álcool quando se comparam resultados.

Relativamente à razão β , como o volume de fase estacionária é constante, a alteração do volume de amostra altera directamente a quantidade de composto extraída. A observação da equação 2 permite verificar que, ao diminuirmos o volume do espaço de cabeça, V_3 , a quantidade de analito extraída pela fase estacionária aumenta, aumentando a sensibilidade do método, dentro de uma concentração correspondente à gama de linearidade do método.

O modo como a extracção é efectuada tem também um impacto elevado na cinética do processo. Quando se usa o modo de espaço de cabeça, o tempo para os compostos atingirem a fase estacionária depende muito da sua volatilidade e capacidade de passagem à fase gasosa (constante de Henry). A agitação e a temperatura podem ter um efeito favorável no processo^{6,7}, com redução no tempo necessário para se atingir condições de reprodutibilidade.

Uma vez que a análise das amostras extraídas por SPME pode ser efectuada por cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e electroforese capilar (CE), os analitos são desorvidos nos sistemas de injeção dos equipamentos, tratando-se de desorção térmica no GC ou por solvente no HPLC e CE.

1.2.5.2. Na desorção

Na desorção térmica em GC, os parâmetros analíticos a considerar são o ponto de ebulição do analito, a espessura da fase estacionária e a temperatura do injector. Assim, do ponto de vista instrumental, os parâmetros a controlar são a temperatura do injector, a posição e profundidade de inserção da fibra no injector e o tempo de desorção⁶.

A utilização de sistemas automáticos de injeção permite um maior controlo das condições de injeção (posição e profundidade da fibra) e o tempo, melhorando a reprodutibilidade da metodologia.

1.3. Metodologias SPME na análise de 2,4,6-tricloroanisole em cortiça e em vinho

A maioria dos estudos sobre defeitos de aroma associados à rolha de cortiça tem incidido quase exclusivamente sobre o TCA. Isto porque o TCA tem vindo a ser reconhecido como sendo o principal problema da rolha de cortiça, presente em mais de 80% dos casos de desvio organoléptico^{25,53}. Assim, os esforços de controlo da qualidade da cortiça, têm vindo a ser investidos essencialmente no desenvolvimento de metodologias nesta área, incluindo na normalização de métodos de ensaio em rolhas de cortiça pela Organização Internacional de Normalização (ISO)⁵⁴.

Na Tabela 8 apresenta-se a evolução das metodologias SPME para a análise de TCA. A primeira publicação sobre análise de TCA por SPME, procedeu à extracção directamente a partir de pedaços de cortiça⁵⁵. Os resultados foram considerados pouco animadores, com baixa reprodutibilidade. Pelo contrário em vinho^{55,56} os resultados demonstram que a técnica de SPME apresentava bons resultados ao nível da reprodutibilidade e linearidade, com limites de detecção (entre 0,5 e 2,9 ng/L) inferior ao limite de percepção sensorial (LPS de 4 ng/L).

Assim, devido às características da cortiça e da sua utilização, têm surgido dois conceitos: TCA total e TCA que potencialmente pode migrar para o vinho^{57,58}. Daí que a análise de TCA na cortiça possa ser realizada directamente sobre a cortiça ou então após a extracção prévia da cortiça com uma matriz líquida simulante de vinho. A análise faz-se sobre a matriz líquida, sendo o resultado definido como TCA libertável (TCA *releasable*).

Tabela 8. Metodologias de SPME aplicadas a vinho e cortiça para análise de compostos voláteis presentes ou transmitidos pela cortiça (TCA e cloroanisóis).

Ano de publicação	Matriz	Metodologia		Limite detecção	Ref.
		Extracção	Análise		
1997	Vinho e Cortiça	Vinho: SPME-PDMS. Rolhas: fraca reprodutibilidade	GC-MS, Método de adição padrão	2,9 ng/L	55
	Vinho	HS-SPME, com PDMS a 45°C.	GC-MS, PI: TCA deuterado.	0,5-2 ng/L LQ 5ng/L	56
1999	Cortiça em solução	As rolhas em solução 24 horas sendo o extracto analisado por HS-SPME com fibra PDMS100µm.	GC-ECD, PI: TCA deuterado.	1-5 ng/L	57
2000	Vinho	SBSE: Extracção por sorção em barra	GC-MS	1-5 ng/L	59
2002	Vinho	HS-SPME. Melhor fase estacionária PDMS em reprodutibilidade e DVB/CAR/PDMS em sensibilidade.	GC-ECD, PI: 2,3,6-triclorotolueno. Método de adição padrão.	1ng/L	61
2003	Vinho	HS-SPME-PDMS.	GC-ECD, PI: 2,4,6-tribromoanisole.	0,15 - 5,4 ng/L	58
2004	Vinho	Extracção por sorção em barra agitadora (SBSE)	GC-ECD	LQ= 1,08 pg/L.	60
	Vinho	HS-SPME: Comparação de fibras, selecciona a DVB/CAR/PDMS	GC-MS	2,5 ng/L	62
	Vinho	HS-SPME: Comparação de fibras, selecciona a PDMS	GC-MS	0,1 ng/L	63
2005	Cortiça	MHS-SPME Múltiplo HS-SPME com fibra DVB/CAR/PDMS	GC-MS	2,5 ng/L	64

LQ: limite de quantificação; PI padrão interno

As publicações que se seguiram têm-se centrado na optimização das condições para a sua análise em vinho, de modo a conhecer a influência de diferentes dispositivos de extracção, por exemplo SBSE^{59,60}, novas fases estacionárias (DVB/CAR/PDMS)^{61,62} e diferentes condições experimentais^{58,60,63}.

Muito recentemente surgiu a metodologia de múltipla extracção na região de espaço de cabeça, MHS-SPME⁶⁴, aplicável para a análise directa de cortiça como matriz sólida, que consiste na extracção sucessiva dos analitos do mesmo *vial*, por HS-SPME, que, por aplicação de modelos teóricos desenvolvidos, apresenta uma estimativa da concentração total dos analitos.

1.4. Enquadramento e objectivos do trabalho

Os estudos de caracterização sensorial de cortiça e do vinho, no sentido de verificar a sua qualidade organoléptica, têm assentado quase exclusivamente na detecção do TCA, seja do ponto de vista instrumental seja sensorial. A presença de TCA tem sido mundialmente aceite como indicador de contaminação sensorial sendo estabelecidos critérios de aceitação/rejeição de lotes de rolhas entre as partes interessadas, com base neste critério.

É conhecido, tanto do ponto de vista de análise de lotes industriais de rolhas⁵³ como através de estudos científicos³⁶, que a correlação entre o defeito sensorial e a quantidade de TCA detectada após extracção completa da rolha é relativamente baixa. Assim, é importante desenvolver metodologias que permitam quantificar em simultâneo o TCA e outros compostos susceptíveis de provocar defeitos sensoriais associados à cortiça, e identificar potenciais factores que interfiram na quantificação do TCA. No presente trabalho será utilizada a metodologia de HS-SPME-GC-MS, uma vez que é actualmente o método internacional em fase final de normalização para análise de TCA na cortiça.

O presente trabalho tem 2 objectivos principais:

- i) Desenvolver uma metodologia de HS-SPME para identificar e quantificar compostos voláteis susceptíveis de provocar defeitos sensoriais em vinhos em contacto com cortiça;
- ii) Pesquisar os compostos padrão estudados em simulantes de vinho que estiveram em contacto com cortiça normal e cortiça com defeitos (bolor e mancha amarela).

A selecção dos compostos a analisar baseou-se num estudo de identificação de compostos encontrados em vinhos que apresentavam desvios organolépticos causados pela cortiça⁴¹: o 2,4,6-tricloroanisole (TCA), o 1-octeno-3-ol (1-Oct-3), o guaiacol (Gua), o 2-metilisoborneol (MIB) e a geosmina (Geo), e outros encontrados na cortiça sujeita a ataque por microorganismos²⁰: o 3-metil-1-butanol (3-MB) e 1-octanol (1-Oct).

No estabelecimento de uma metodologia de SPME é muito importante a escolha da fase estacionária, uma vez que a quantidade e tipo de compostos que são extraídos da amostra depende da espessura e características físico-químicas do filme. A opção de selecção de uma fase estacionária não polar de 100 µm de PDMS teve a ver com o facto de esta ser indicada para analitos não polares, nomeadamente compostos voláteis, sendo utilizada na análise de aromas em alimentos e bebidas^{65,66} e fragâncias²¹, tendo vindo a ser utilizada na determinação de TCA em vinho e em rolhas (Tabela 8), sendo igualmente esta fase a indicada no método internacional normalizado para análise de TCA na cortiça⁵⁴.

Relativamente ao modo de extracção, seleccionou-se a extracção na região de espaço de cabeça dadas as características da matriz relativamente ao valor de LogP (oct/ag) dos compostos a analisar e pelo facto de ser o método de referência em normalização pela ISO. Os compostos voláteis têm coeficientes de difusão na fase gasosa tipicamente de 4 ordens de grandeza superiores aos registados nos líquidos⁷, encontrando-se grande parte dos mesmos na fase gasosa antes do início da extracção. Além disso, esta técnica protege a fibra do efeito adverso de substâncias não voláteis de elevado peso molecular que possam estar na matriz.

Relativamente aos parâmetros experimentais: razão $1/\beta$ ^{55,61}, adição de sal⁵⁵, agitação⁵¹ e tempo de desorção^{56,61}, foram utilizados valores da literatura obtidos na optimização de metodologias HS-SPME para análise de TCA em vinho. O estudo de optimização da metodologia incidiu sobre: i) temperatura de extracção, ii) linearidade global, iii) linearidade e reprodutibilidade relativamente a cada padrão e estimativa dos Factores Relativos de Resposta da metodologia de SPME e iv) avaliação dos efeitos de interferência da concentração de um composto sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz.

Parte II

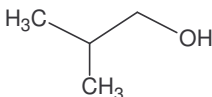
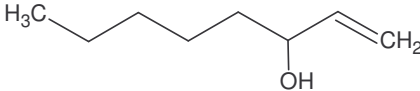
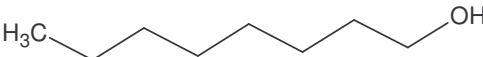
Materiais e Métodos

2.1. Materiais

2.1.1. Reagentes e padrões

Foram utilizados os seguintes padrões: 3-metil-1-butanol (98,5%), guaiacol ($\geq 98\%$), 1-octeno-3-ol (98%) e 1-octanol (99%) (Sigma-Aldrich, EUA), 2,4,6-tricloroanisole (99%) (Sigma-Aldrich, Alemanha), geosmina (98%) e 2-metilisoborneol (98%) (Wako, Alemanha), encontrando-se na Figura 7 as respectivas fórmulas e estruturas químicas, números CAS, descritores de aroma e limites de percepção sensorial.

Usou-se, ainda, cloreto de sódio (Merck, Alemanha), etanol p.a. (Riedel-deHaen) e ácido L-(+) tartárico (Panreac, Barcelona).

		
3-Metil-1-butanol (3-MB)	1-Octeno-3-ol (1-Oct-3)	1-Octanol (1-Oct)
CAS 123-51-3	CAS 3391-86-4	CAS 111-87-5
C ₅ H ₁₂ O	C ₈ H ₁₆ O	C ₈ H ₁₈ O
DA: whisky	DA: cogumelos	DA: cera
LPS: 300 mg/L	LPS: 20 µg/L	LPS: -

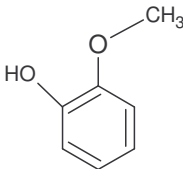
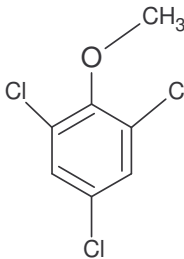
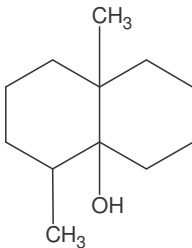
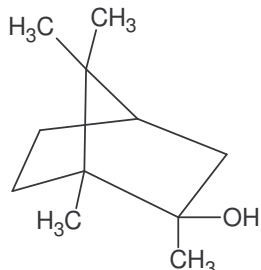
			
Guaiacol (Gua)	2,4,6-Tricloroanisole (TCA)	Geosmina (Geo)	2-Metilisoborneol (MIB)
CAS 90-05-1	CAS 87-40-1	CAS 19700-21-1	CAS 2371-42-8
C ₇ H ₈ O ₂	C ₇ H ₅ Cl ₃ O	C ₁₂ H ₂₂ O	C ₁₁ H ₂₀ O
DA: fumado, madeira	DA: bolor, mofo	DA: terra, mofo	DA: terra, mofo, bolor
LPS: 20 000 ng/L	LPS: 4 ng/L	LPS: 25 ng/L	LPS: 30 ng/L

Figura 7. Estrutura e fórmula química, número CAS, descritor de aroma (DA) e limite de percepção sensorial (LPS) dos padrões em estudo.

Tabela 9. Dados físico-químicos dos padrões em estudo⁶⁷.

Composto	MM	p.e. (°C)	Pressão de vapor* (10 ⁻³ mmHg)	Constante de Henry* (atm.cm ³ /mol)	Solubilidade em água* (mg/L)	LogP ^{a)} (oct/ag)
3-MB	88,15	131,1	2370	14,0	2,67x10 ⁴	1,16
1-Oct-3	128,21	174,5	-	-	Insolúvel	-
1-Oct	130,23	195,1	79,4	24,5	540	3,00
Gua	124,14	205	103	1,2	1,87x10 ⁴	1,32
MIB	168,28	-	32,0	8,9	305	3,31
TCA	211,47	241	22,8	130	10 (20°C)	4,11
Geo	182,31	270	2,14	11,8	157	3,57

a) Log P octanol/água: coeficiente de partição do composto entre octanol e água

* a 25°C

A solução simulante de vinho foi sempre preparada antes da realização dos ensaios, consistindo numa solução etanol/água a 10% (v/v), com adição de ácido tartárico até pH 3,5.

2.1.2. Preparação de rolhas de cortiça (N, B e MA) e posterior engarrafamento

As rolhas de cortiça foram fabricadas numa unidade industrial, encontrando-se o esquema de preparação representado na Figura 8. Selecionaram-se duas pranchas de cortiça provenientes da região do Alto Alentejo, com calibre marca (31/40 mm) e classe de qualidade visual de 1^a/3^a. Uma das pranchas não apresentava qualquer tipo de defeito visual, sendo industrialmente classificada como normal (N), e a outra classificada industrialmente como cortiça com mancha amarela (MA).

Estas pranchas foram cozidas separadamente, sendo a primeira (N) cozida junto com o 1^o lote de cortiça da semana, tendo assim água renovada, e a segunda (MA) junto com o lote seguinte, de forma a não haver contaminação cruzada. Após a cozedura foram deixadas em repouso na zona industrial de estabilização, mas separadamente das outras pranchas de cortiça em curso de produção.

Ao fim de duas semanas iniciou-se a fabricação, utilizando as especificações técnicas para produção de rolhas de calibre 45X24 mm, ou seja, na operação de rabaneação foram cortadas em bandas de 47,0 mm de largura, seguindo-se a brocagem com tubos cilíndricos ocos de 24,7 mm de diâmetro interno.

As rolhas fabricadas a partir da prancha MA apresentavam manchas amarelas, características do defeito localizadas nos topos.

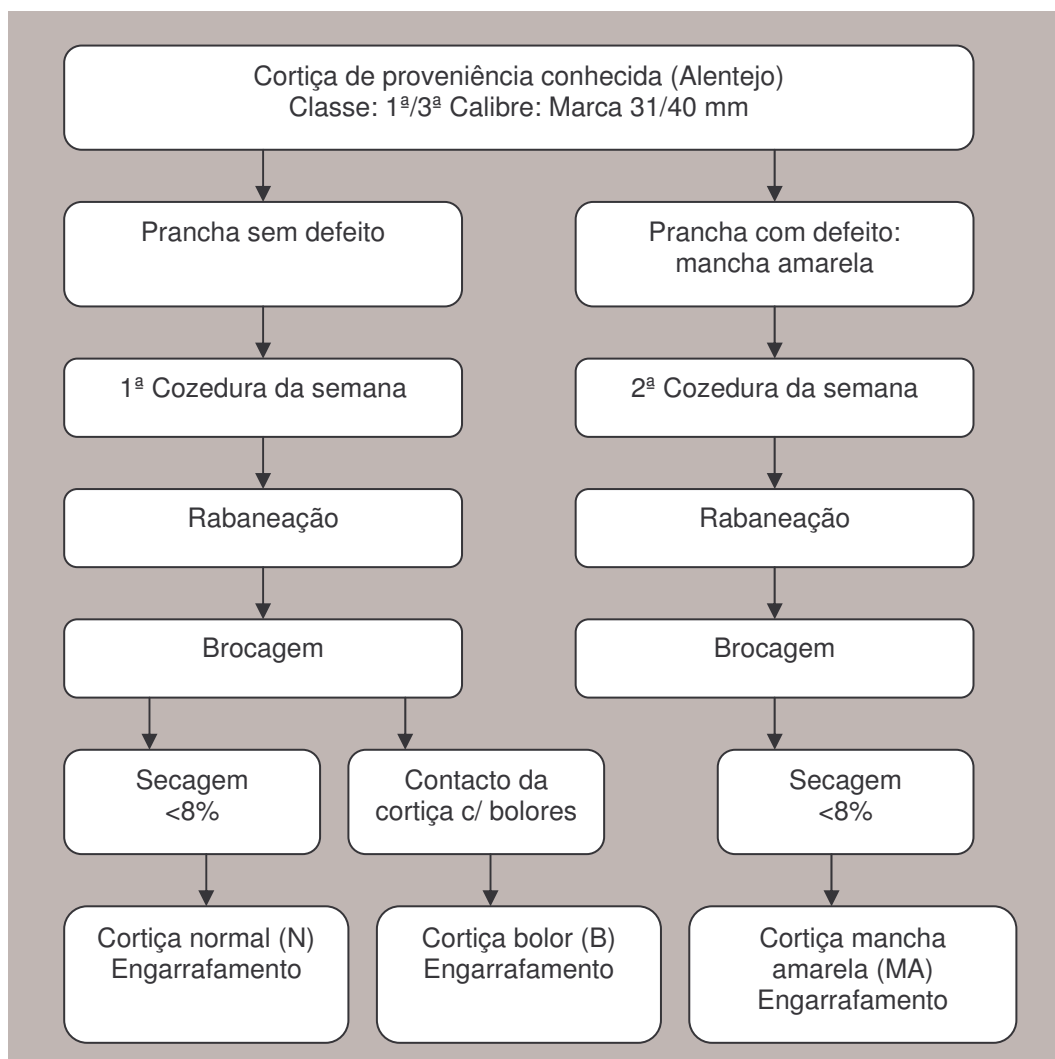


Figura 8. Esquema de preparação das amostras de cortiça usadas nos engarrafamentos.

As rolhas resultantes da prancha N foram ainda divididas em 2 grupos:

i) o primeiro, classificado como normal (N), foi imediatamente seco a humidade inferior a 8%, para evitar o crescimento de microrganismos;

ii) o segundo, classificado como amostra bolor (B), foi deixado com a humidade de processamento (12-15%) durante 7 dias entre pranchas de cortiça em processo de estabilização industrial (já com notório crescimento de microrganismos). Não foram identificados os microrganismos presentes, mas constituem a flora do ambiente fabril.

De cada um dos 3 tipos de amostras, N, B e MA, e sem que tenha sido efectuado qualquer processo de lavagem/desinfecção ou tratamento de superfície, 20 rolhas foram colocadas em garrafas de 750 mL de capacidade, do tipo bordalesa de cor verde, onde previamente se tinham introduzido 750 mL do simulante de vinho, resultando assim 20 réplicas para cada tipo de cortiça.

O rolhamento foi efectuado no mesmo dia, recorrendo a uma rolhadora de 4 maxilas, com compressão cilíndrica a 15,5 mm. Após um período de cerca de 1 hora para recuperação dimensional da cortiça, as garrafas foram deixadas em repouso em ambiente de pouca luminosidade com temperatura amena, durante 13 meses, até à realização da análise por SPME.

2.1.3. Equipamentos

A determinação analítica foi efectuada utilizando um cromatógrafo de gás Varian CP3800 com detector de massa/massa Saturn 2000 (Varian, EUA) de captura de iões, equipado com coluna capilar CPSil 8CB *low bleed*/MS 30mx0,25mmx0,25µm (Varian, Holanda), dotado de um amostrador automático Combipal (CTC Analytics, Suíça), com forno de incubação e com agitação.

De forma a obter uma boa resolução cromatográfica, foi desenvolvido o seguinte programa: temperatura inicial do forno de 35°C durante 2 minutos, seguindo-se um programa de 35 a 250°C a 8°C por minuto, com um tempo final de 3 minutos. A temperatura do injectador foi de 260°C e o fluxo do gás de arraste (hélio) fixou-se em 1 mL/min.

A injeção foi efectuada em modo splitless (5 minutos), sendo feito uma análise de um branco por cada grupo de 5 amostras. O branco consistia num *vial* com solução simulante de vinho e cloreto de sódio (2g/L).

Os espectros de massa foram obtidos por ionização por impacto electrónico com energia de 70eV e uma corrente de emissão de 50 μ A, com um varrimento entre 30 e 250 m/z. Os dados foram adquiridos com o software DS-MS Workstation versão 6.3.0 (Varian, USA).

A fase estacionária, PDMS com 100 μ m de espessura (Supelco, Bellfonte, EUA), foi condicionada durante 2 horas a 250°C (indicação do fabricante 30 minutos a 250°C), sendo utilizada no dispositivo automático Combipal.

Foram utilizados *vials* de 20 mL com septo de 8 mm PTFE/Silicone e tampa magnética.

2.2. Optimização da metodologia de HS-SPME

Os parâmetros relativos a volume de espaço de cabeça/volume de amostra (razão β), adição de sal, tempo de sorção e tempo de desorção foram estabelecidos com base na literatura:

- i) Razão $1/\beta=0,6$, alíquotas de 7,5 mL de padrão ou extracto de solução de amostra nos *vials* de 20 mL^{55,61};
- ii) Adição de cloreto de sódio: 0,2 g/mL⁵⁵;
- iii) Tempo de extracção: 45 minutos⁵¹, sob agitação a 1000 r.p.m;
- iv) Desorção a 260°C durante um período de 3 minutos^{56,61}.

Seguidamente foram realizados os seguintes estudos:

- Temperatura de extracção;
- Linearidade global da metodologia;
- Linearidade e reprodutibilidade relativamente a cada padrão e estimativa dos Factores Relativos de Resposta da metodologia de SPME;
- Avaliação dos efeitos de interferência da concentração de um composto sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz.

2.2.1. Efeito da temperatura de extracção

Seleccionando um composto para cada nível de concentração (ng/L, μ g/L e mg/L), procedeu-se ao estudo de efeito da temperatura de extracção sobre a quantificação de 3-MB, Gua e TCA. Para cada composto foram preparadas soluções-padrão nas concentrações indicadas na Tabela 10, em solução simulante de vinho. Os compostos foram analisados individualmente.

As temperaturas testadas foram de 30, 40 e 50°C, sendo a análise efectuada em quintuplicado.

Tabela 10. Gama de concentração ensaiada para o estudo do efeito da temperatura para o 3-metil-1-butanol, guaiacol e 2,4,6-tricloroanisole.

Composto	Concentração				
3-MB (mg/L)	54,0	104,0	155,0	201,0	273,0
Gua (µg/L)	4,7	11,8	23,6	35,3	47,1
TCA (ng/L)	5,8	14,5	29,0	43,5	58,0

2.2.2. Linearidade global da metodologia de HS-SPME

Tomando como referência as gamas de concentração em estudo, seleccionadas de acordo com os respectivos limites de percepção sensorial^{19,41}, prepararam-se 5 soluções-padrão com os 7 compostos presentes em 5 níveis de concentração (Tabela 11). Assim, a concentração total varia entre 41,5 mg/L e 275,2 mg/L. A análise foi efectuada em quintuplicado, com temperatura de extracção de 30°C.

Tabela 11. Concentrações usadas nos ensaios de linearidade global da metodologia de HS-SPME.

Solução	Concentração							Concentração total (mg/L)
	3-MB (mg/L)	1-Oct-3 (µg/L)	1-Oct (µg/L)	Gua (µg/L)	MIB (ng/L)	TCA (ng/L)	Geo (ng/L)	
A	41,5	10,2	20,1	5,3	30,0	14,5	42,0	41,5
B	75,7	20,4	20,2	5,3	60,0	29,0	84,0	75,8
C	106,4	30,6	60,3	19,4	120,0	43,5	126,0	106,5
D	152,0	40,8	80,4	38,7	240,0	87,0	252,0	152,2
E	275,0	51,0	100,5	51,6	480,0	130,5	378,0	275,2

2.2.3. Reprodutibilidade e linearidade da metodologia e estimativa dos Factores Relativos de Resposta (FRR)

Para o estudo da reprodutibilidade da metodologia foram preparadas soluções padrão de 1 a 5 (Tabela 12), sendo estes ensaios também usados para preparar as curvas de calibração para cada composto e para estimar os Factores Relativos de Resposta (FRR) relativos à metodologia de SPME. A reprodutibilidade foi avaliada através do coeficiente de variação calculado para 5 réplicas. A linearidade foi avaliada pela análise do coeficiente de regressão das curvas de calibração.

As soluções padrão foram preparadas em simulante de vinho e analisadas em quintuplicado.

Tabela 12. Concentrações usadas para estudo da reprodutibilidade, linearidade e estimativa dos Factores Relativos de Resposta (FRR).

Composto	Solução-padrão				
	1	2	3	4	5
3-MB (mg/L)	47,7	71,6	95,4	143,0	191,0
1-Oct-3 (µg/L)	10,7	21,4	26,7	32,0	42,7
1-Oct (µg/L)	20,8	41,6	78,0	156,0	208,0
Gua (µg/L)	5,7	12,9	19,4	38,7	51,6
MIB (ng/L)	8,0	20,0	30,0	60,0	80,0
TCA (ng/L)	2,0	5,0	7,4	14,8	19,8
Geo (ng/L)	8,4	21,0	31,4	63,0	84,0
Concentração total (mg/L)	47,7	71,7	95,5	143,2	191,3

2.2.4. Avaliação dos efeitos de interferência da concentração de um composto sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz

Com o objectivo de avaliar possíveis efeitos de interferência da concentração de um composto sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz, foi preparada uma solução base contendo os 7 compostos e várias outras soluções-padrão

nas quais apenas se varia a concentração de um composto (Tabela 13). Seguidamente comparou-se a área cromatográfica obtida para cada composto na solução base em relação às áreas cromatográficas que sofreram modificações na concentração apenas de 1 composto. A análise foi efectuada em quintuplicado, numa gama de concentração total entre 47,7 e 190,9 mg/L.

Tabela 13. Gamas de concentração usadas para avaliação dos efeitos de interferência.

Composto	Solução base Concentração	Factor de variação de concentração em relação à solução-base			
3-MB	95,4 mg/L	0,5	0,8	1,5	2,0
1-Oct-3	26,7 µg/L	0,4	0,8	1,2	1,6
1-Oct	78,0 µg/L	0,3	0,5	2,0	2,7
Gua	19,4 µg/L	0,3	0,7	2,0	2,7
MIB	30,0 ng/L	0,3	0,7	2,0	2,7
TCA	7,4 ng/L	0,3	0,7	2,0	2,7
Geo	31,4 ng/L	0,3	0,7	2,0	2,7

2.3. Pesquisa dos compostos-padrão nos simulantes de vinho rolhados com cortiça N, B e MA

De acordo com os resultados da secção anterior (2.2.) estabeleceu-se a metodologia de análise HS-SPME/GC-MS que pareceu ser a mais adequada:

- i) Razão $1/\beta=0,6$, alíquotas de 7,5 mL do extracto de cada réplica nos *vials* de 20 mL;
- ii) Adição de cloreto de sódio: 0,2 g/mL;
- iii) Temperatura de extracção 30°C;
- iii) Tempo de extracção: 45 minutos, sob agitação a 1000 r.p.m;
- iv) Desorção a 260°C durante um período de 3 minutos.

Esta metodologia foi aplicada na pesquisa dos compostos padrão em simulantes de vinho rolhados com cortiça N, B e MA. Antes de se retirar a rolha, as garrafas foram agitadas para homogeneização do seu conteúdo. As rolhas foram retiradas e, de cada garrafa, transferindo-se o extracto para o *vial* onde se procedeu à extracção HS-SPME.

2.4. Tratamento de dados

2.4.1. Temperatura de extracção

Para cada composto, e cada temperatura, foi estabelecida a correlação entre a área cromatográfica e a concentração. O coeficiente de variação foi calculado como a razão do desvio padrão das determinações efectuadas em relação à média, expresso em percentagem.

Para cada temperatura de extracção, foram efectuadas 5 determinações de cada composto para cada nível de concentração (Tabela 10), resultando num total de 75 determinações por composto, 25 para cada nível de temperatura.

Os FRR foram calculados para cada composto e cada temperatura como a razão mi/me , na qual mi representa o quociente entre a área cromatográfica do composto i e a sua concentração, e me representa o quociente entre a área cromatográfica do etanol e a sua concentração (7,9 g/L), a qual se manteve constante em todos os ensaios.

2.4.2. Linearidade global da metodologia HS-SPME

Para cada uma das soluções (Tabela 11), foi determinada a área cromatográfica correspondente a cada um dos 7 compostos em estudo, tendo sido efectuadas 5 réplicas de cada solução, resultando num total de 175 determinações.

A área total foi calculada como sendo a soma das áreas de todos os compostos em cada uma das soluções, e a concentração total, resultante da soma das concentrações de todos os compostos em cada uma das soluções. Seguidamente verificou-se se as áreas cromatográficas totais variam, ou não, de forma linear (R^2) com a concentração total da matriz.

2.4.3. Reprodutibilidade e linearidade da metodologia HS-SPME

A reprodutibilidade foi avaliada pela análise do coeficiente de variação, calculado como a razão do desvio padrão das 5 réplicas em relação ao valor médio, expresso em percentagem (soluções-padrão indicadas na Tabela 12).

A linearidade foi avaliada através da análise do coeficiente de correlação das curvas de calibração efectuadas (áreas cromatográficas vs. concentração, para cada composto).

2.4.4. Estimativa dos Factores Relativos de Resposta

Os FRR da metodologia de SPME foram calculados para cada composto como a razão mi/me , na qual mi representa o quociente entre a área cromatográfica do composto i e a sua concentração, e me representa o quociente entre a área cromatográfica do etanol e a sua concentração (7,9 g/L), a qual se manteve constante em todos os ensaios. Pelo facto dos valores dos FRR dos 7 compostos em estudos apresentarem entre si diferenças de várias ordens de grandeza foram também calculados os respectivos $\text{Log}(\text{FRR})$.

Foram efectuadas 5 determinações de cada composto para cada nível de concentração, resultando num total de 25 determinações por composto (gama de concentração usada indicada na Tabela 13).

2.4.5. Avaliação dos efeitos de interferência da concentração de um composto sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz

Foram utilizadas duas metodologias para estudar o efeito da composição da matriz sobre a resposta obtida por SPME. Para cada composto foram efectuadas 25 determinações, resultando em 175 determinações.

Na primeira metodologia foi realizada uma análise do efeito da variação individual. Para cada composto foi calculado o valor de A_x/A_0 , em que A_0 representa a área do composto i na solução base e A_x é a área do mesmo composto i na solução em que ocorre variação da concentração. Para verificar a relevância estatística deste efeito foi aplicado o teste de t -Student, com nível de confiança de 95%.

No caso do 1-Oct verificou-se um efeito significativo pelo que se procedeu ao cálculo da concentração estimada para as áreas resultantes e respectivo coeficiente de variação, através das curvas de calibração estabelecidas para cada um dos compostos (2.4.3.). Uma vez que a concentração adicionada (solução base) se manteve constante e as áreas resultantes foram significativamente diferentes, procedeu-se, para cada um dos compostos, ao cálculo da média de concentração de todas as determinações (n=25) como se o efeito do 1-Oct não fosse conhecido. O intervalo de confiança (IC) dos resultados foi calculado através da seguinte fórmula:

$$IC = \pm \frac{s \ t_{95\%,24}}{\sqrt{n}}$$

sendo *s* o desvio padrão, *t*_{95%,24} o parâmetro de t-Student, com um grau de confiança de 95% e 24 graus de liberdade, e *n* o número de réplicas.

Para cada valor de concentração de 1-Oct, foi efectuada uma análise da diferença entre as variâncias (teste de Fisher) e analisada a significância da variância dos resultados, com 95% de confiança e (4, 4) graus de liberdade.

Na segunda metodologia foi efectuada uma análise de regressão, comparando as áreas de todos os compostos para todas as concentrações, através da análise de dados do programa Excel for Windows da Microsoft, versão 2000, com nível de confiança de 95%.

2.4.6. Pesquisa dos compostos-padrão nos simulantes de vinho rolhados com cortiça N, B e MA

Foi pesquisada a presença dos padrões em estudo nos cromatogramas obtidos, sendo confirmada a presença dos compostos de acordo com o tempo de retenção e com o espectro de massa dos padrões puros. Confirmada a presença de um dado composto, foi determinada a sua área cromatográfica, sendo a quantificação efectuada por recurso à respectiva curva de calibração.

Parte III

Resultados e Discussão

3.1. Optimização da metodologia HS-SPME

Na Tabela 14 encontram-se os tempos de retenção relativos a cada um dos compostos seleccionados para pesquisa e quantificação. As Figuras 9 a 15 apresentam os espectros de massa dos padrões utilizados, os quais, juntamente com os respectivos tempos de retenção, permitiram confirmar a identificação destes nos simulantes de vinho engarrafados com cortiças N, B e MA.

Tabela 14. Tempos de retenção e iões (m/z) característicos para os compostos padrão.

Tempo de retenção (min)	Composto	Iões (m/z)
4,2	3-MB	41, 42, 55, 70
9,3	1-Oct-3	43, 57, 69, 72
11,3	1-Oct	55, 56, 69, 83
11,6	Gua	53, 81, 109, 124
14,4	MIB	67, 95, 121, 136
16,6	TCA	167, 195, 197, 210
18,2	Geo	81, 97, 112, 126

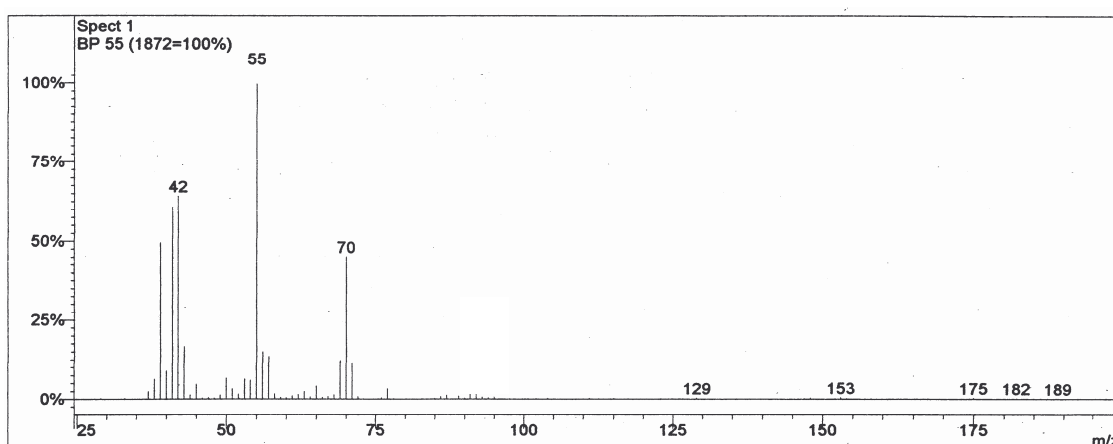


Figura 9. Espectro de massa do 3-metil-1-butanol, tempo de retenção 4,2 minutos.

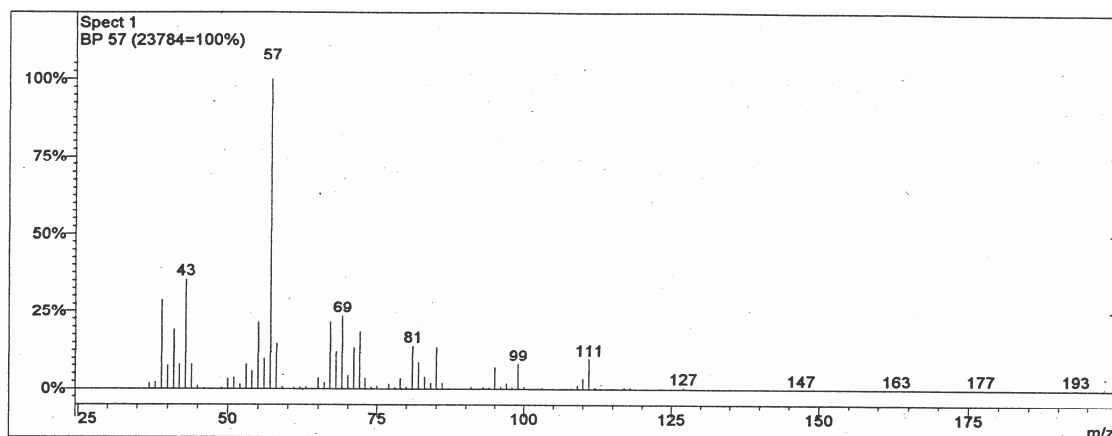


Figura 10. Espectro de massa do 1-octeno-3-ol, tempo de retenção 9,3 minutos.

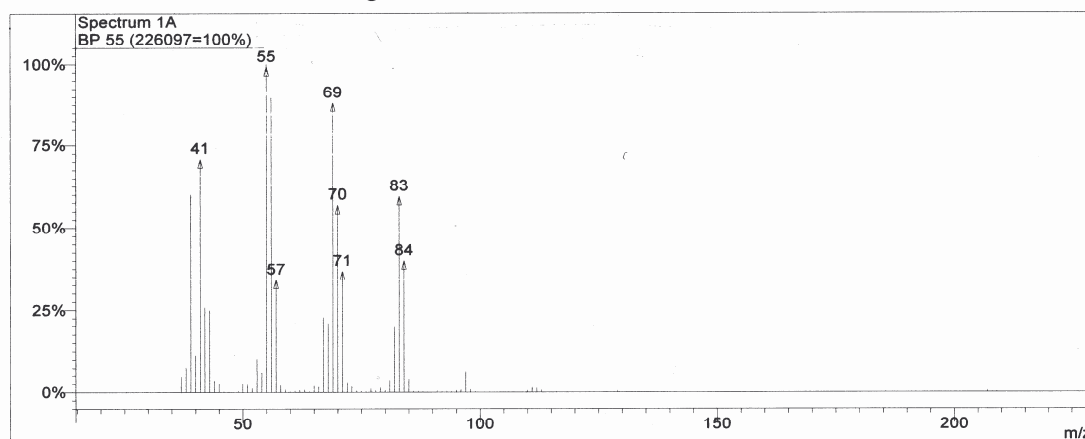


Figura 11. Espectro de massa do 1-octanol, tempo de retenção 11,3 minutos.

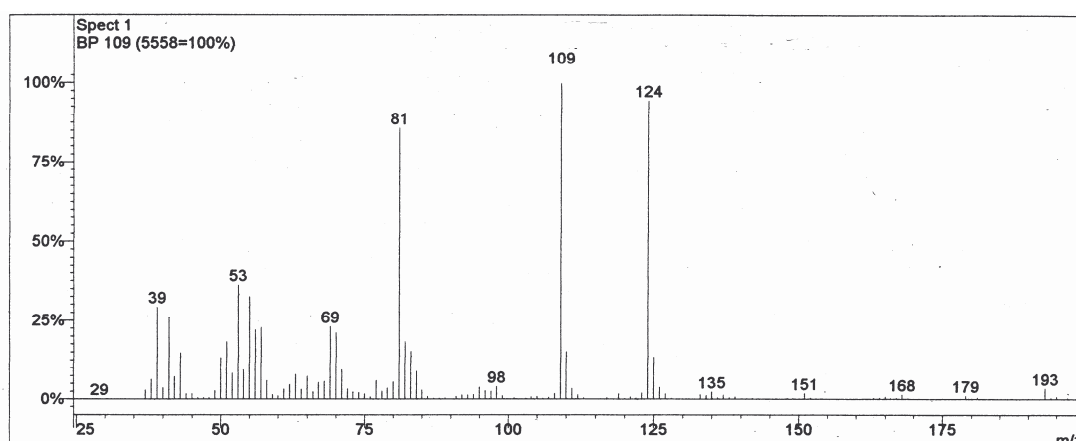


Figura 12. Espectro de massa do guaiacol, tempo de retenção 11,6 minutos.

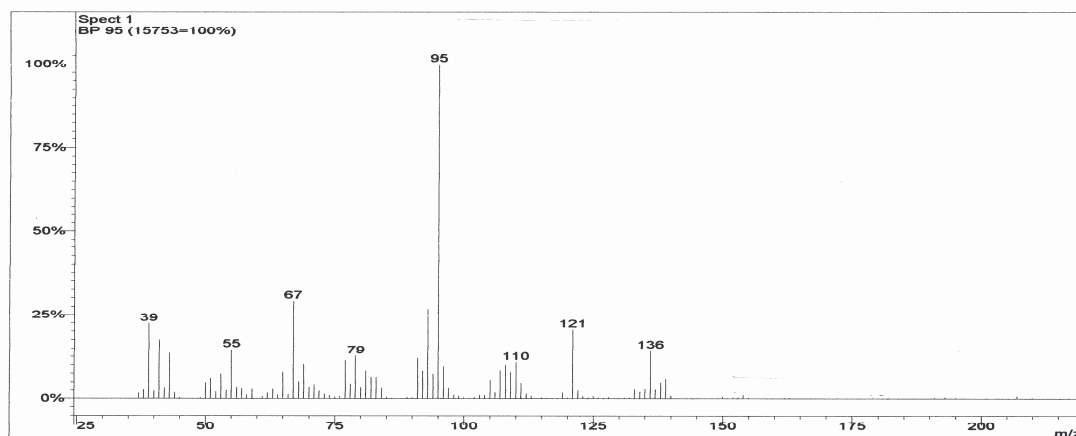


Figura 13. Espectro de massa do 2-metilisoborneol, tempo de retenção 14,4 minutos.

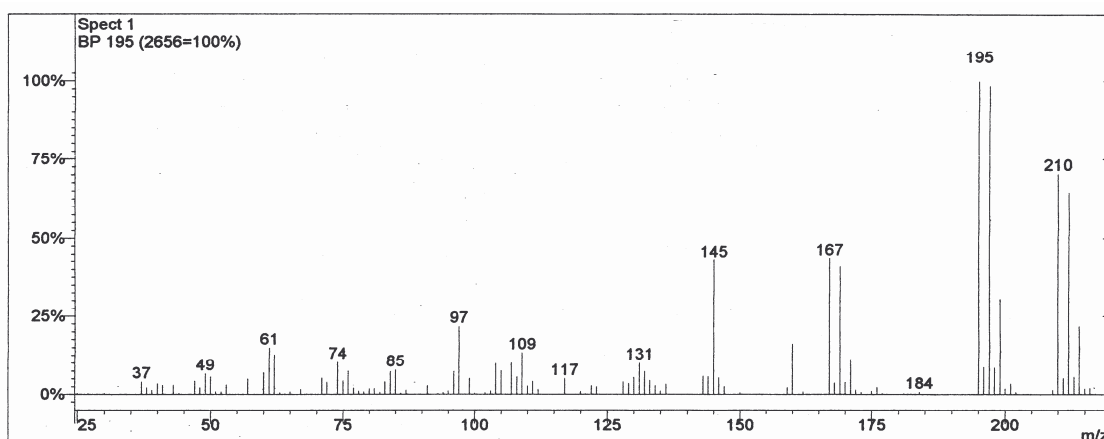


Figura 14. Espectro de massa do 2,4,6-tricloroanisole, tempo de retenção 16,6 minutos.

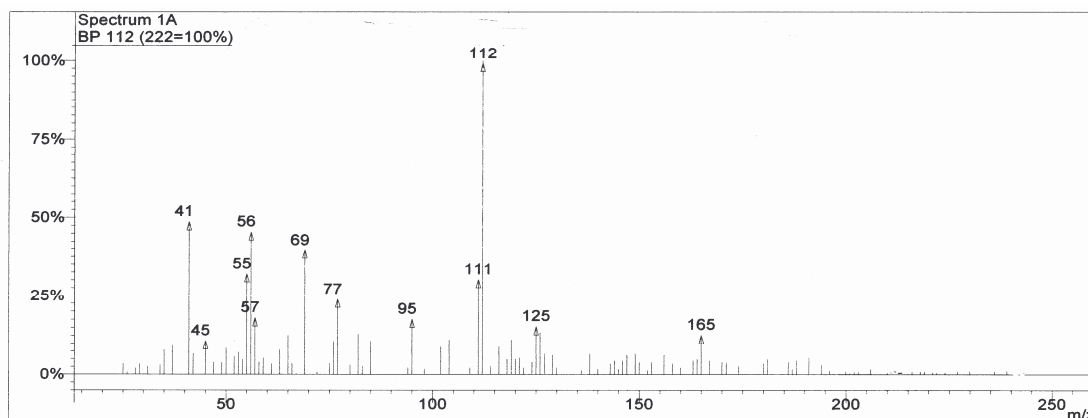


Figura 15. Espectro de massa da geosmina, tempo de retenção 18,2 minutos.

3.1.1. Efeito da temperatura de extracção

O efeito da temperatura sobre a área cromatográfica dos compostos presentes na matriz pode ser influenciado por 3 factores. (i) sendo a absorção dos compostos pela fase estacionária um processo exotérmico, o aumento da temperatura provoca a difusão das moléculas de compostos absorvidas pela fase estacionária para a fase gasosa, o que contribui para a redução do coeficiente de partição fase estacionária/fase gasosa (k_1); (ii) o aumento da temperatura também aumenta a solubilidade dos compostos na matriz o que causa uma redução no coeficiente de partição fase gasosa/fase líquida (k_2); (iii) o aumento de temperatura pode levar a um aumento da volatilidade dos compostos presentes na matriz, o que contribui para o aumento do coeficiente de partição fase gasosa/fase líquida (k_2)⁵¹. O efeito da temperatura de extracção sobre as áreas cromatográficas dependerá de um equilíbrio entre estes três factores.

Quando os dois primeiros efeitos (i e ii) prevalecem sobre o aumento da volatilidade dos compostos com o aumento da temperatura (iii), ocorrem reduções nas áreas cromatográficas. Quando o efeito da temperatura sobre a volatilidade se sobrepõe aos efeitos na absorção pela fase estacionária e na solubilidade, verificam-se aumentos nas áreas cromatográficas.

Seguidamente será analisado de forma separada o efeito da temperatura de extracção sobre as áreas cromatográficas do 3-MB, GUA e do TCA, assim, como sobre a linearidade e sensibilidade da metodologia. Os resultados relativos ao efeito da temperatura sobre a reprodutibilidade encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15. Gamas de concentração e coeficientes de variação para o 3-metil-1-butanol, guaiacol e 2,4,6-tricloroanisole a diferentes temperaturas (n=75).

Composto	Concentração	C.V. Coeficiente de variação (%)					
		30°C		40°C		50°C	
		Média	Min-Máx	Média	Min-Máx	Média	Min-Máx
3-MB	54,0 – 273,0 mg/L	7,3	4,4 – 10,8	12,4	4,4 - 17,8	16,3	7,6 - 29,6
Gua	4,7 – 47,1 µg/L	5,3	3,7 – 9,9	8,9	5,1 – 16,6	12,2	5,5 – 18,9
TCA	5,8 – 58,0 ng/L	4,8	3,7 – 8,4	9,7	5,3 – 16,4	14,8	8,3 – 17,4

Verifica-se que os coeficientes de variação das áreas cromatográficas duplicam para o Gua e quase triplicam para o 3-MB e TCA com o aumento da temperatura, em todas as gamas de concentração usadas (Tabela 15). Resultados similares já observados na análise de álcoois, ésteres, compostos voláteis e semi-voláteis em vinho⁶⁸, indicam que em termos de reprodutibilidade, a temperatura de extracção de 30°C é a mais adequada.

O efeito da temperatura sobre as áreas cromatográficas será analisado, individualmente para cada composto.

3.1.1.1. Sobre as áreas do 3-metil-1-butanol

Para o 3-MB verifica-se um aumento das áreas cromatográficas com o aumento da temperatura, o que se traduz pelo aumento do seu Log(FRR) de 1,0 para 1,2. Este resultado está de acordo com trabalhos anteriores que referem que a extracção em região de espaço de cabeça a temperaturas superiores à temperatura ambiente (> 20°C) é mais eficiente para compostos de elevada volatilidade^{49,51}, como é o caso do 3-MB.

Observa-se no entanto uma diminuição da linearidade da resposta com o aumento da temperatura (R^2 varia de 0,9852 para 0,9306). Este facto deve-se ao aumento da variabilidade das áreas cromatográficas com o aumento da temperatura (ver barras de erro da Figura 16).

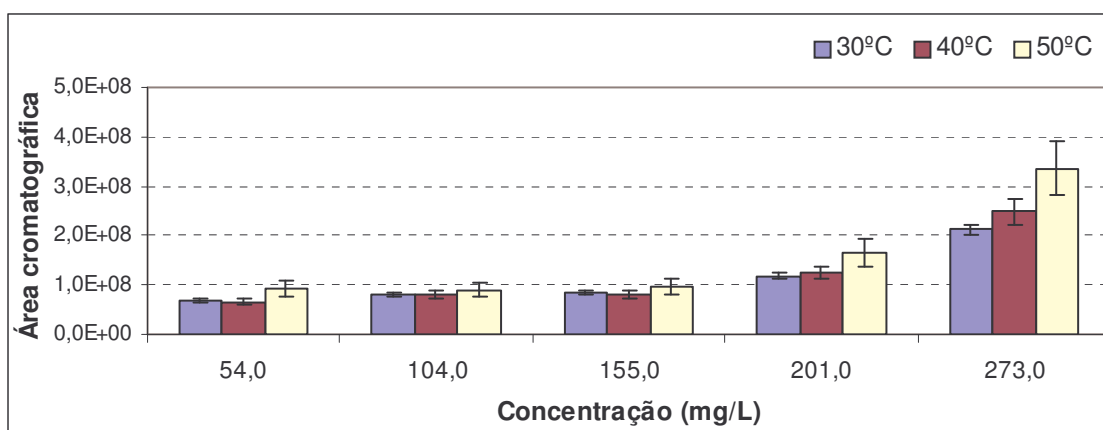


Figura 16. Efeito da temperatura de extracção na resposta obtida por HS-SPME para o 3-metil-1-butanol (os valores indicados na figura correspondem às concentrações adicionadas ao simulante de vinho/matriz).

Verifica-se um aumento na sensibilidade da metodologia, avaliada pelo declive da equação da curva de calibração (Tabela 16) com o aumento da temperatura, o qual passa de 92408 para 164757 (incremento de ca. 78%).

Tabela 16. Parâmetros estatísticos relativos ao efeito da temperatura de extracção, para o 3-metil-1-butanol (n=75).

T (°C)	R ²	Declive	FRR	Log(FRR)
30	0,9852	92408	9,3	1,0
40	0,9488	118429	10,7	1,0
50	0,9306	164757	14,9	1,2

R²: coeficiente de regressão linear; FRR: Factor relativo de resposta.

O aumento da temperatura aumenta a quantidade de 3-MB extraída e a sensibilidade da metodologia. O facto de causar um efeito negativo na variabilidade dos resultados obtidos e na linearidade, indica que a temperatura de extracção de 30°C parece ser a mais adequada.

3.1.1.2. Sobre as áreas cromatográficas do guaiacol

O aumento da temperatura não parece ter qualquer efeito sobre a quantidade de Gua extraída, avaliado a partir do valor de Log(FRR), que se mantém em ca. 3,9 (Tabela 17). Resultado similar foi referido para o Gua em estudos de SPME usando uma fase estacionária de poliacrilato⁶⁹.

Observa-se uma diminuição da linearidade da resposta com o aumento da temperatura (R² varia de 0,9609 para 0,9326). Este facto deve-se ao aumento da variabilidade das áreas cromatográficas com o aumento da temperatura (ver barras de erro da Figura 17).

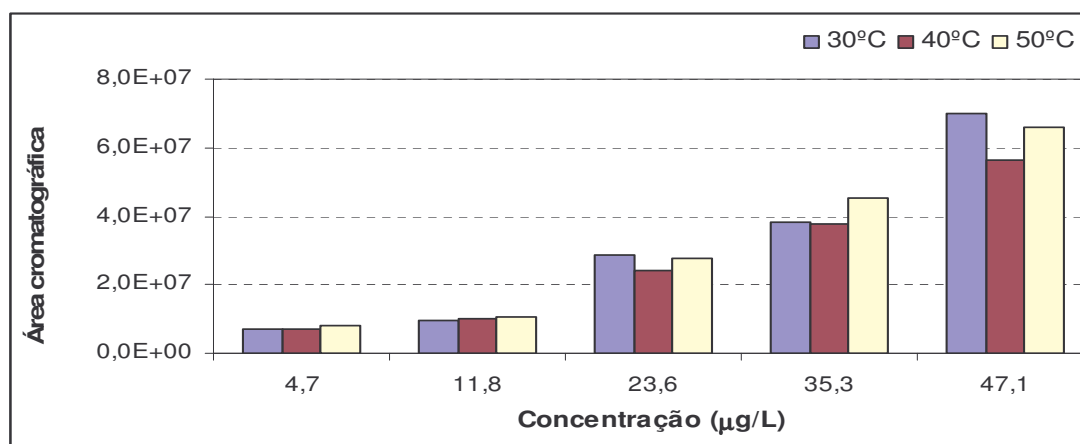


Figura 17. Efeito da temperatura de extracção na resposta obtida por HS-SPME para o guaiacol (os valores indicados na figura correspondem às concentrações adicionadas ao simulante de vinho/matriz).

Verifica-se igualmente que não existe um efeito significativo do aumento da temperatura de extracção sobre a sensibilidade da metodologia (Tabela 17), avaliada pelo declive, o qual varia de forma irregular entre 234152 e 293379.

Tabela 17. Parâmetros estatísticos relativos ao efeito da temperatura de extracção, para o guaiacol (n=75).

T (°C)	R ²	Declive	FRR	Log(FRR)
30	0,9609	293379	8870	3,9
40	0,9446	234152	6545	3,8
50	0,9326	279685	8426	3,9

R²: coeficiente de regressão linear; FRR: Factor relativo de resposta.

O aumento da temperatura não tem efeito sobre a quantidade de Gua extraída nem sobre a sensibilidade da metodologia. O facto de causar um efeito negativo na variabilidade dos resultados obtidos e na linearidade, indica que a temperatura de extracção de 30°C parece ser a mais adequada.

3.1.1.3. Sobre as áreas cromatográficas do 2,4,6-tricloroanisole

Para o TCA verifica-se que o aumento da temperatura causa uma diminuição acentuada na área cromatográfica e consequentemente sobre a quantidade extraída (Figura 18), o que está de acordo com a diminuição do Log(FRR) de 2,4 para 2,1 (Tabela 18). Resultados semelhantes foram já referidos na literatura com a mesma fibra^{58,61}.

Este comportamento pode dever-se ao facto de o TCA apresentar uma constante de Henry elevada ($130 \text{ atm.cm}^3/\text{mol}$). A 30°C , o TCA já se encontra na fase gasosa em percentagem elevada. Assim, o efeito do aumento da temperatura para 40°C e 50°C não deverá ter uma influência muito significativa sobre a sua passagem para a fase gasosa, tendo no entanto efeito sobre o aumento da solubilidade na matriz e diminuição da absorção na fase estacionária.

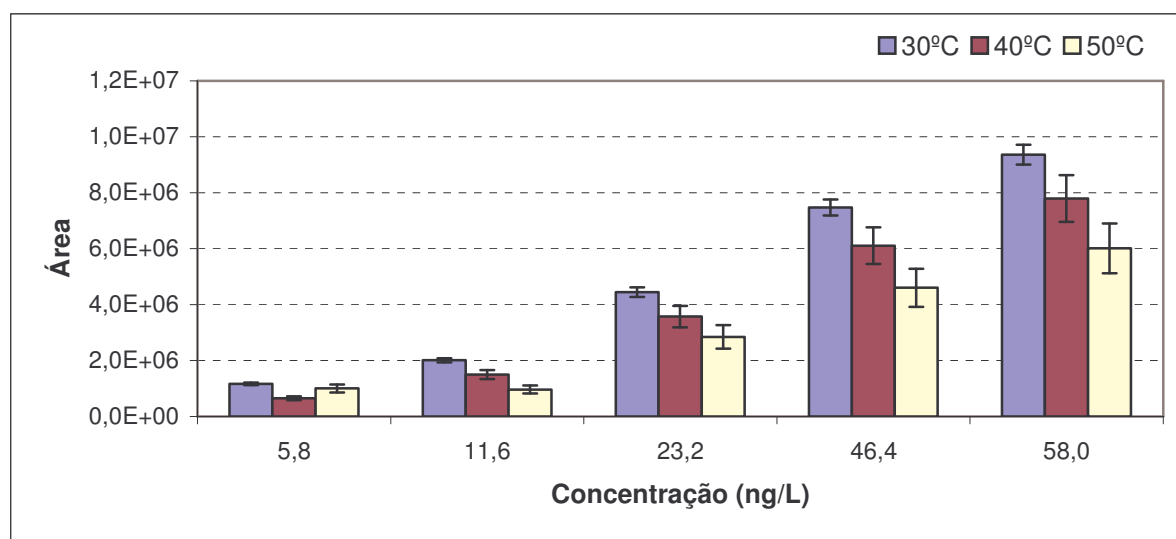


Figura 18. Efeito da temperatura de extracção na resposta obtida por HS-SPME para o 2,4,6-tricloroanisole (os valores indicados na figura correspondem às concentrações adicionadas ao simulante de vinho/matriz).

Observa-se uma diminuição acentuada da linearidade da resposta com o aumento da temperatura (R^2 varia de 0,9930 para 0,8902). Este facto deve-se ao aumento da variabilidade das áreas cromatográficas com o aumento da temperatura (ver barras de erro da Figura 18).

Verifica-se igualmente que existe um efeito negativo do aumento da temperatura de extracção sobre a sensibilidade da metodologia (Tabela 18), avaliada pelo declive, o qual passa de 31075 para 17778 (decréscimo de ca. 43%).

Tabela 18. Parâmetros estatísticos relativos ao efeito da temperatura de extracção, para o 2,4,6-tricloroanisole (n=75).

T (°C)	R ²	Declive	FRR	Log(FRR)
30	0,9930	31075	224	2,4
40	0,9361	26795	190	2,3
50	0,8902	17778	131	2,1

R²: coeficiente de regressão linear; FRR: Factor relativo de resposta.

O aumento da temperatura reduz a quantidade de TCA extraída. Afecta, também, de forma negativa a variabilidade, sensibilidade e linearidade da metodologia, o que indica que a temperatura de sorção de 30°C parece ser a mais adequada.

Devido ao facto de, para todos os compostos, se verificar que o aumento da temperatura tem um efeito negativo sobre a variabilidade e a linearidade da metodologia e uma vez que diminui de forma muito acentuada a área cromatográfica do TCA, a temperatura de extracção de 30°C parece ser a mais adequada.

3.1.2. Linearidade global da metodologia HS-SPME

As fases estacionárias do tipo absorvente, como a PDMS, virtualmente nunca ficam saturadas^{49,50} e apresentam uma resposta linear numa ampla gama de concentração. No entanto, existem estudos que referem a possibilidade de ocorrência de saturação das fases estacionárias do tipo absorvente^{6,51}. Esta situação pode levar a efeitos de interferência da concentração de um composto sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz, o que pode trazer implicações nas análises quantitativas decorrentes. Assim, neste estudo pretende-se definir uma gama de

concentração em que se verifique uma relação linear entre a área cromatográfica total e a concentração total da matriz, o que permitirá avaliar a linearidade global da metodologia. Posteriormente será realizada uma avaliação para cada composto. A Figura 19 representa a variação das áreas cromatográficas totais vs concentração total da matriz.

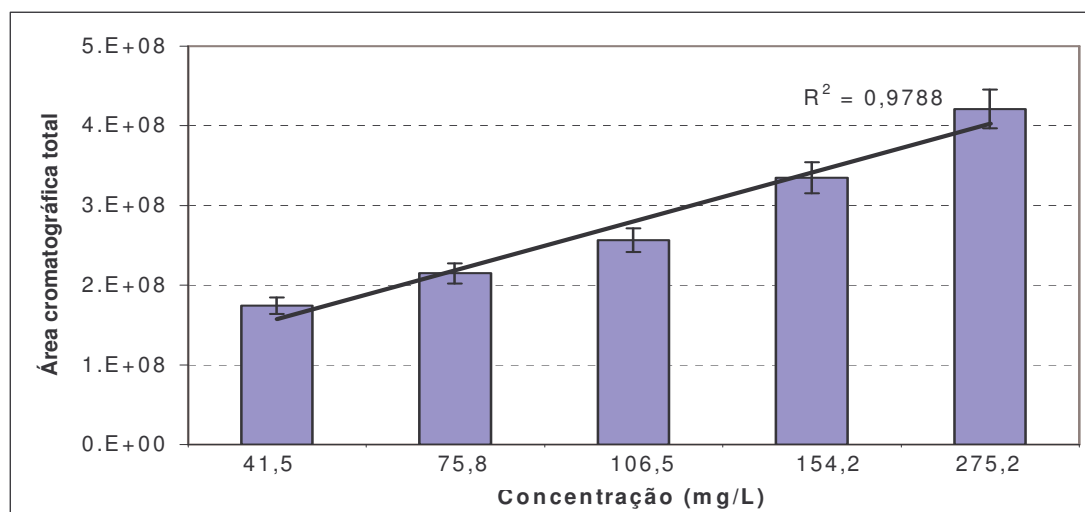


Figura 19. Variação da área cromatográfica total em função da concentração dos 7 padrões na matriz (n=25).

Como se pode verificar pela Figura 19, as áreas cromatográficas totais variam de forma linear (R^2 0,9788) com a concentração total da matriz. Devido ao facto dos padrões utilizados estarem presentes em gamas de concentração muito distintas (mg, μ g e ng) e sendo o 3-MB o composto presente em maior concentração, é de realçar que estas áreas cromatográficas totais estão dependentes principalmente deste composto. Estes resultados indicam que para uma concentração total entre 41,5 e 275,2 mg/L, não se verifica saturação da fase estacionária.

3.2. Reprodutibilidade e linearidade da metodologia HS-SPME

A reprodutibilidade da metodologia foi estudada através dos valores dos coeficientes de variação das áreas cromatográficas dos 7 padrões utilizados (Tabela 19), os quais variam entre 3,2 e 9,8%, o que se pode considerar como sendo bastante satisfatório para este tipo de análise. Esta variação pode estar associada a vários factores, entre os quais a volatilidade dos compostos, a concentração na matriz e a afinidade para a fase estacionária⁵¹.

Tabela 19. Gama de concentração e coeficiente de variação dos compostos em estudo (n= 175).

Composto	Gama de concentração	CV Coeficiente de variação (%)		
		Média	Mínimo	Máximo
3- MB	47,7 – 191,0 mg/L	7,7	6,4	9,8
1-Oct-3	10,7 - 42,7 µg/L	6,5	4,4	8,3
1-Oct	20,8 – 208,0 µg/L	5,8	5,7	5,9
Gua	5,2 - 51,6 µg/L	4,8	4,1	5,6
MIB	8,0 – 80,0 ng/L	4,9	3,7	6,7
TCA	2,0 – 19,8 ng/L	4,9	4,2	5,7
Geo	8,4 – 84,0 ng/L	4,7	3,2	5,8

Dentro do grupo de compostos em estudo verifica-se que o Gua, MIB, TCA e Geo apresentam coeficientes de variação muito similares (4,7 - 4,9%), pelo que pode dizer-se que estes 4 compostos têm a mesma resposta em termos de reprodutibilidade. O 1-Oct e o 1-Oct-3 apresentam valores de coeficientes de variação que também não diferem muito entre si, 6,5 e 5,8%, respectivamente. Finalmente merece destaque o 3-MB pelo facto de ser o composto que apresenta os valores mais elevados (7,7%). Apesar deste valor ser considerado aceitável para este tipo de análises, este resultado pode ser explicado pelo facto do 3-MB apresentar uma menor afinidade para a fase estacionária comparativamente com os outros compostos em estudo (avaliada pelo valor de Log(FRR) apresentando no ponto 3.3). Por outro lado, pelo facto de se tratar de um composto de

baixo peso molecular, podendo ser absorvido e desorvido durante o tempo em que se procede à extracção, aumentando assim a variabilidade do processo⁴⁹.

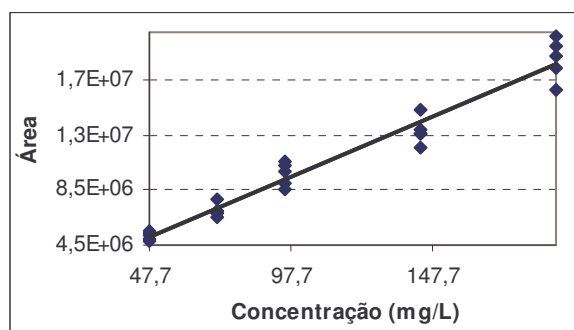
Para o estudo da linearidade prepararam-se curvas de calibração para os 7 compostos em estudo. A Tabela 20 representa os parâmetros estatísticos das curvas de calibração dos compostos em análise. Os coeficientes de correlação foram estabelecidos fazendo variar a concentração do composto (Tabela 12), mantendo fixa a concentração dos restantes compostos na solução base (Tabela 13).

Para cada um dos 7 compostos em estudo, observa-se uma relação linear entre a área cromatográfica e a sua concentração, com valores para o quadrado do coeficiente de correlação (R^2) situados entre 0,9517 e 0,9886, o que indica que a solução etanol/água é capaz de formar uma matriz estável para quantificar os compostos padrão, de modo a produzir um equilíbrio reproduzível entre a fase estacionária e o espaço de cabeça da solução etanólica⁵¹.

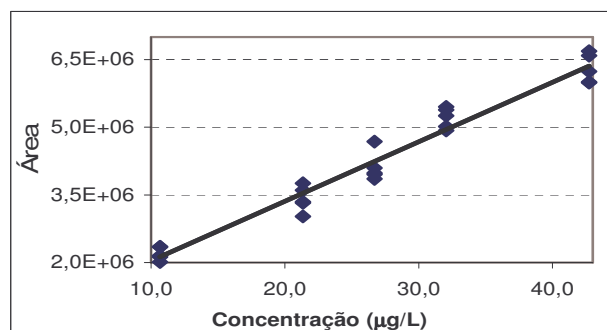
Apesar de se trabalhar em 3 níveis de concentração diferentes, mg/L para o 3-MB, µg/L para o 1-Oct-3, 1-Oct e Gua, e na gama de ng/L para o MIB, TCA e Geo, não se verifica influência deste factor quer na reprodutibilidade, avaliada pelo coeficiente de variação, que na linearidade, avaliada pelo coeficiente de regressão (Tabelas 19 e 20). As curvas de calibração estabelecidas encontram-se representadas na Figura 20.

Tabela 20. Parâmetros estatísticos das curvas de calibração dos compostos em análise (n=175).

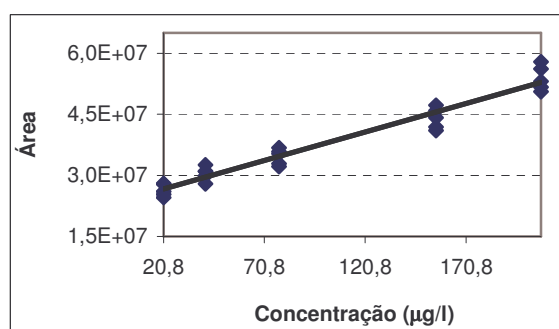
Composto	Gama de concentração	R^2	Equação da recta
3-MB	47,7 – 191,0 mg/L	0,9602	$y = 882579x + 88118$
1-Oct-3	10,7 – 42,7 µg/L	0,9611	$y = 132026x + 721129$
1-Oct	20,8 – 208,0 µg/L	0,9516	$y = 139744x + 23761514$
Gua	5,2 – 51,6 µg/L	0,9849	$y = 82646x + 147513$
MIB	8,0 - 80,0 ng/L	0,9749	$y = 1829,5x + 258399$
TCA	2,0 – 34,8 ng/L	0,9886	$y = 1426,1x + 20205$
Geo	8,4 – 84,0 ng/L	0,9659	$y = 638,66x + 269789$



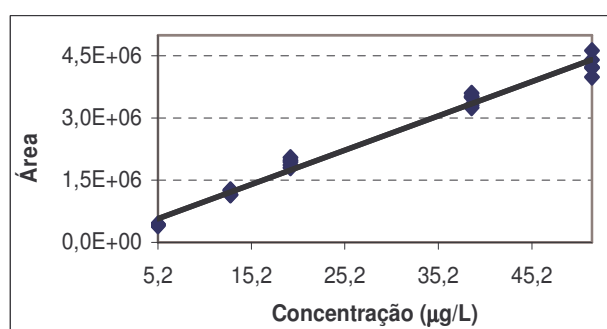
A. 3-Metil-1-butanol (47,7 a 191 mg/L)



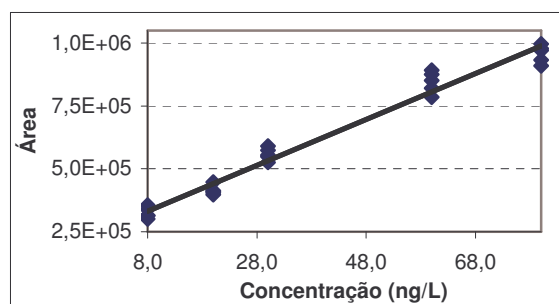
B. 1-Octeno-3-ol (10,7 a 42,7 µg/L)



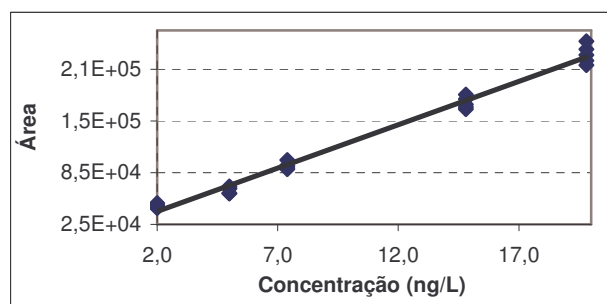
C. 1-Octanol (20,8 a 208 µg/L)



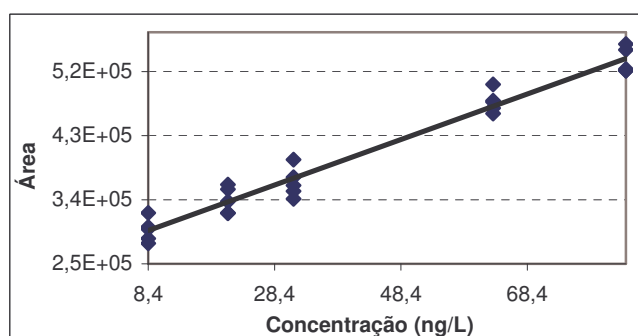
D. Guaiacol (5,16 a 51,6 µg/L)



E. 2-Metilisoborneol (8,0 a 80,0 ng/L)



F. 2,4,6-Tricloroanisole (2,0 a 34,8 ng/L)



G. Geosmina (8,4 a 84,0 ng/L)

Figura 20. Curvas de calibração dos compostos em estudo, em fase estacionária PDMS a 30°C.

3.3. Estimativa dos Factores Relativos de Resposta

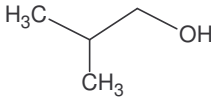
Os diversos tipos de fases estacionárias que podem ser utilizados na técnica de SPME podem apresentar alguma selectividade para diferentes tipos de analitos a serem extraídos. Este facto pode originar que entre uma gama de compostos presentes numa dada matriz exista um que, apesar de estar presente em menor concentração, seja extraído de uma forma mais eficiente, o que será traduzido por uma maior área cromatográfica. Assim, o FRR estabelece a relação entre a concentração do composto na matriz líquida e as respectivas áreas cromatográficas, sendo considerado como resultado das características de cada composto, como o seu peso molecular, ponto de ebulição, estrutura molecular, solubilidade na matriz líquida e afinidade para ser absorvido pela fase estacionária⁵¹. Na Tabela 21 estão indicados os FRR e os Log(FRR) obtidos para os 7 padrões, estes valores foram normalizados relativamente à resposta do etanol.

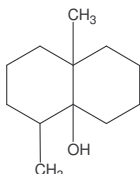
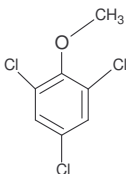
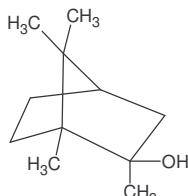
Tabela 21. Factores relativos de resposta (FRR) da metodologia de SPME relativamente aos compostos em estudo, presentes numa matriz etanol/água 10%, valores normalizados relativamente à resposta do etanol (n=175).

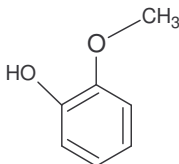
Composto	Gama de concentração	FRR		Log(FRR)
		Médio	Gama	
3-MB	47,7 – 191,0 mg/L	10	9 - 11	1,0
1-Oct-3	10,7 – 42,7 µg/L	18041	16032 - 22382	4,3
1-Oct	20,8 – 208,0 µg/L	57487	24943 - 122044	4,9
Gua	5,2 – 51,6 µg/L	8885	8252 - 9894	3,9
MIB	8,0 – 80,0 ng/L	408	231 - 782	2,6
TCA	2,0 – 19,8 ng/L	196	154 - 320	2,3
Geo	8,4 – 84,0 ng/L	297	122 - 680	2,5

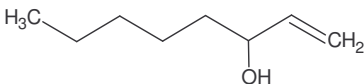
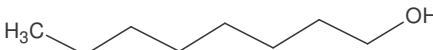
De acordo com os Log(FRR) definiram-se 4 grupos (Tabela 22): grupo 1 (3-MB com Log(FRR)=1), Grupo 2 (Geo, TCA e MIB com Log(FRR) de 2 a 3), grupo 3 (Gua com Log(FRR)=4) e grupo 4 (1-Oct-3 e 1-Oct com Log(FRR)> 4).

Tabela 22. Características físico-químicas dos compostos, agrupados de acordo com os respectivos Factores Relativos de Resposta (FRR).

Grupo 1 Log(FRR)=1		
		3-MB
Solubilidade (água)	2,67 x10 ⁴ mg/L	
LogP (oct/ag)	1,16	
P. de vapor	2370 x10 ⁻³ mmHg	
C. Henry (kH)	14,0 atm.cm ³ /mol	

Grupo 2 Log(FRR) de 2 a 3				
	Geo	TCA	MIB	
	Solubilidade (água)	157 mg/L	10 (20°C) mg/L	305 mg/L
	LogP (oct/ag)	3,57	4,11	3,31
	P. de vapor	2,14 x10 ⁻³ mmHg	22,8 x10 ⁻³ mmHg	32,0 x10 ⁻³ mmHg
C. Henry (kH)	11,8 atm.cm ³ /mol	130 atm.cm ³ /mol	8,9 atm.cm ³ /mol	

Grupo 3 Log(FRR)= 4		
		Gua
Solubilidade (água)	1,87x10 ⁴ mg/L	
LogP (oct/ag)	1,32	
P. de vapor	103 x10 ⁻³ mmHg	
C. Henry (kH)	1,2 atm.cm ³ /mol	

Grupo 4 Log(FRR)>4			
	1-Oct-3	1-Oct	
	Solubilidade (água)	Ins.	540 mg/L
	LogP (oct/ag)	-	3,00
	P. de vapor	-	79,4 x10 ⁻³ mmHg
C. Henry (kH)	-	24,5 atm.cm ³ /mol	

Verifica-se que no grupo 1 se encontra o composto de menor massa molecular, com volatilidade (2370×10^{-3} mmHg) e solubilidade em água ($2,67 \times 10^4$ mg/L) elevadas. Neste caso, do equilíbrio entre o efeito da volatilidade vs solubilidade, parece ser o efeito da solubilidade a ter um papel preponderante. Estudos anteriores⁴⁹ indicam existir uma relação linear entre a MM e o Log(FRR), o que pode explicar o valor de Log(FRR) determinado para o 3-MB.

No Grupo 2 estão contidos os compostos com menor volatilidade (pressão de vapor de 2×10^{-3} a 32×10^{-3} mmHg), o que faz com que possam necessitar de maior tempo para que ocorra a sua passagem para o espaço de cabeça, com excepção do TCA que por apresentar um valor de constante de Henry elevado ($130 \text{ atm.cm}^3/\text{mol}$) apresenta elevada afinidade para a fase gasosa. Estes compostos apresentam baixa solubilidade em água (de 10 a 305 mg/L), e os valores de $\text{LogP}(\text{oct/ag}) \cong 4$ indicam relativa solubilidade em solventes orgânicos. Assim, o etanol pode funcionar como co-solvente. Este facto associado à sua baixa volatilidade pode explicar o valor de FRR determinado para este grupo.

No grupo 3 encontra-se o Gua, composto mais volátil (pressão de vapor 103×10^{-3} mmHg) e mais solúvel ($1,87 \times 10^4$ mg/L) que os compostos do grupo 2. Neste caso, do equilíbrio entre o efeito da volatilidade vs solubilidade, parece ser o efeito da volatilidade a ter um papel preponderante. A este há a acrescentar a afinidade para a fase estacionária o que se traduz por um valor relativamente elevado de Log(FRR).

No grupo 4 encontram-se o 1-Oct-3 e 1-Oct, compostos com maior afinidade para a fase gasosa, evidenciada por terem valores de solubilidade em água relativamente baixo (insolúvel e 540 mg/L para o 1-Oct-3 e 1-Oct, respectivamente), o que está de acordo com anteriores estudos⁵¹ que indicam que a maior afinidade com a fase estacionária se verifica para compostos com menor solubilidade em água e menor volatilidade.

3.4. Avaliação dos efeitos de interferência da concentração de um composto sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz

No sentido de avaliar os efeitos de interferência da concentração de um composto sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz foi preparada uma solução base contendo os 7 compostos e várias outras soluções-padrão nas quais apenas se varia a concentração de um composto (Tabela 13). Os resultados encontram-se nas Tabelas 23 a 30. A concentração total máxima da matriz é 190,9 mg/L, valor este contido na gama de linearidade da metodologia.

Os resultados obtidos foram tratados de acordo com 2 metodologias. Na análise do efeito da variação individual da concentração de cada um dos compostos sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz, através da análise de t-Student; Para análise do efeito da variação da concentração dos compostos constituintes da matriz sobre a área individual de cada um dos compostos são propostos modelos de regressão linear.

3.4.1. Análise do efeito da variação individual da concentração de cada um dos compostos sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz

3.4.1.1. Estudo do efeito da variação da concentração do 3-metil-1-butanol

Partindo da solução base, foram efectuadas variações da concentração do 3-MB (0,5 a 2,0 vezes), mantendo-se os restantes compostos com concentração constante. Na Tabela 23 apresenta-se, para cada composto, a razão entre A_x/A_0 , sendo A_x a área do composto i na solução em que ocorre variação da concentração de 3-MB e A_0 a área do mesmo composto na solução base.

A aplicação do teste t -Student aos dados anteriores indica que não há diferença significativa entre os valores de A_0 e A_x , com 95% de confiança. Assim, a variação na concentração do 3-MB não interfere na quantificação dos outros compostos, nas gamas de concentração em estudo.

Tabela 23. Efeitos de interferência da concentração do 3-metil-1-butanol sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz (n= 25).

Varição de concentração (x)	1-Oct-3	1-Oct	Gua	MIB	TCA	Geo
0,5	0,911*	1,001	0,988	0,995	1,022	1,028
0,8	0,989	0,997	1,004	0,972	1,011	1,018
1,5	0,988	1,010	1,002	0,976	1,038	0,999
2,0	0,963	0,985	1,020	0,984	1,010	1,013

(x) Factor de variação em relação à concentração da solução base (95,4mg/L).

* razão entre A_x/A_0 , sendo A_x a área do composto i na solução em que ocorre variação da concentração de 3-MB e A_0 a área do mesmo composto na solução base.**3.4.1.2. Estudo do efeito da variação da concentração do 1-octeno-3-ol**

Partindo da solução base, foram efectuadas variações da concentração do 1-Oct-3 (0,4 a 1,6 vezes), mantendo-se os restantes compostos com concentração constante. Na Tabela 24 apresenta-se, para cada composto, a razão entre A_x/A_0 , sendo A_x a área do composto i na solução em que ocorre variação da concentração de 1-Oct-3 e A_0 a área do mesmo composto na solução base.

Tabela 24. Efeitos de interferência da concentração do 1-octeno-3-ol sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz (n=25).

Varição de concentração (x)	3-MB	1-Oct	Gua	MIB	TCA	Geo
0,4	0,971*	1,111	1,040	1,046	1,028	1,024
0,8	1,062	1,071	1,034	1,093	0,988	0,960
1,2	1,050	1,014	0,998	1,026	1,002	0,982
1,6	0,986	0,893	1,011	1,002	0,991	0,913

(x) Factor de variação em relação à concentração da solução base (26,7 µg/L).

* razão entre A_x/A_0 , sendo A_x a área do composto i na solução em que ocorre variação da concentração de 1-Oct-3 e A_0 a área do mesmo composto na solução base.

A aplicação do teste *t*-Student aos dados anteriores indica que não há diferença significativa entre os valores de A_0 e A_x , com 95% de confiança. Assim, a variação na concentração do 1-Oct-3 não interfere na quantificação dos outros compostos, nas gamas de concentração em estudo.

3.4.1.3. Estudo do efeito da variação da concentração do 1-octanol

Partindo da solução base, foram efectuadas variações da concentração do 1-Oct (0,3 a 2,7 vezes), mantendo-se os restantes compostos com concentração constante. Na Tabela 25 apresenta-se, para cada composto, a razão entre A_x/A_0 , sendo A_x a área do composto *i* na solução em que ocorre variação da concentração de 1-Oct e A_0 a área do mesmo composto na solução base.

Tabela 25. Efeitos de interferência da concentração do 1-octanol sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz (n=25).

Variação de concentração (x)	3-MB	1-Oct-3	Gua	MIB	TCA	Geo
0,3	1,355*	0,980**	1,691	1,312	1,239	1,848
0,5	1,369	0,983**	1,519	1,219	1,157	1,626
2,0	1,065**	0,972**	0,814	0,814	0,872	0,751
2,7	1,071**	0,951**	0,830	0,629	0,724	0,504

(x) Factor de variação em relação à concentração da solução base (78,0 µg/L).

* razão entre A_x/A_0 , sendo A_x a área do composto *i* na solução em que ocorre variação da concentração de 1-Oct e A_0 a área do mesmo composto na solução base.

** Não há diferença significativa entre os resultados (*t*-Student, 95%).

A Tabela 25 indica que variações na concentração do 1-Oct provocam alterações significativas nas áreas cromatográficas do Gua, MIB, TCA e Geo. Verifica-se, ainda, que não provoca alterações significativas na área cromatográfica do 1-Oct-3 para todas as concentrações estudadas e interfere nas áreas cromatográficas do 3-MB, apenas para as concentrações mais elevadas de 1-Oct (incrementos de 2,0 e 2,7 vezes)

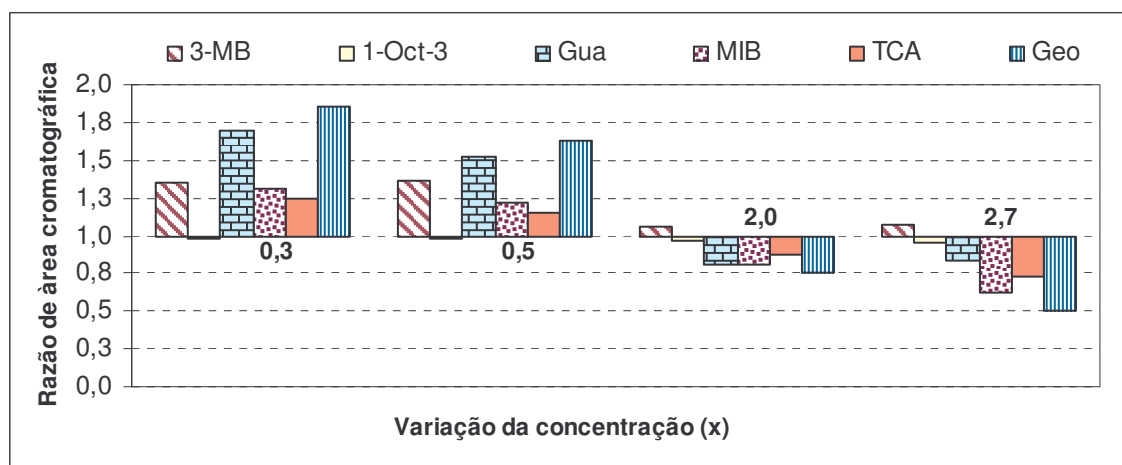


Figura 21. Variação das áreas dos compostos com concentração adicionada constante por interferência da variação da concentração do 1-octanol (0,3, 0,5, 2,0 e 2,7 vezes) a concentração da solução-base.

O efeito da variação da concentração do 1-Oct sobre as áreas cromatográficas dos restantes compostos da matriz (Figura 21) está relacionado com a alteração da composição do espaço de cabeça e posterior sorção na fase estacionária (Tabela 22). Em relação à afinidade da fase estacionária, analisando os respectivos FRR (Tabela 21), verifica-se que o 1-Oct, sendo o composto que apresenta o maior FRR ($\text{Log}(\text{FRR}) = 4,9$), causa interferência em todos os compostos com menor FRR mas não naquele que tem FRR próximo do seu, no caso o 1-Oct-3 ($\text{Log}(\text{FRR}) = 4,3$). O Gua apesar de apresentar elevado FRR ($\text{logFRR} = 3,9$), apresenta baixa afinidade para a fase gasosa (constante de Henry $1,2 \text{ atm.cm}^3/\text{mol}$) onde é efectuada a extracção e elevada solubilidade em água ($1,87 \times 10^4 \text{ mg/L}$).

A Geo, o MIB e o TCA são os compostos mais influenciados pela variação da concentração do 1-Oct pois além de apresentarem baixos valores de FRR ($\text{Log}(\text{FRR}) = 2,6, 2,5$ e $2,3$ respectivamente) estão presentes em concentrações muito baixas (ng/L). Dentro deste grupo a Geo é o composto mais influenciado por apresentar menor volatilidade (pressão de vapor $2,14 \times 10^{-3} \text{ mmHg}$) e o TCA é menos influenciado porque, apesar de apresentar volatilidade relativamente baixa (pressão de vapor $22,8 \times 10^{-3} \text{ mmHg}$), apresenta uma elevada afinidade para a fase gasosa (constante de Henry $130 \text{ atm.cm}^3/\text{mol}$). Finalmente o 3-MB apesar de apresentar baixo FRR ($\text{Log}(\text{FRR}) = 1,0$) que indicaria uma elevada interferência devido à variação da concentração do 1-Oct, só sofre alteração com diminuição de concentração e não se verifica efeito com o aumento.

O efeito da variação da concentração do 1-Oct sobre os outros compostos, expresso em termos de concentração, é apresentado na Tabela 26.

Tabela 26. Interferência da variação da concentração de 1-octanol (23,4 a 210,6 µg/L) na concentração estimada dos restantes compostos da solução base (n=25).

1-Oct	3-MB	1-Oct-3	Gua	MIB	TCA	Geo
Concentração adicionada						
78,0 µg/L	95,4 mg/L	26,7 µg/L	19,4 µg/L	30,0 ng/L	7,4 ng/L	31,4 ng/L
Concentração estimada						
20,8 µg/L	129,4 (8,8)*	26,1 (6,1)	33,5 (5,8)	45,3 (4,9)	15,4 (4,6)	50,8 (4,8)
41,6 µg/L	129,9 (8,3)	26,2(5,7)	30,0 (5,5)	40,8 (5,0)	13,3 (5,2)	44,2 (4,9)
156,0 µg/L	101,7 (9,4)	25,9 (4,3)	15,5 (5,9)	20,9 (6,4)	5,1 (4,1)	21,1 (5,3)
208,0 µg/L	102,3 (10,7)	25,3 (6,2)	15,9 (4,3)	11,8 (4,8)	2,8 (4,7)	9,2 (5,7)
	111,7 ± 14,8**	26,8 ± 0,45	22,9 ± 7,5	28,3 ± 12,4	6,8 ± 4,8	28,2 ± 15,1

* valor de coeficiente de variação (%)

** Média e intervalo de confiança, $t_{95\%, 24}$, com 95% de confiança e 24 graus de liberdade.

Verifica-se que não há diferença significativa entre os valores de coeficiente de variação para cada valor de concentração de 1-Oct. Assim, de modo a avaliar o impacto do efeito do 1-Oct sobre a quantificação dos restantes compostos, e uma vez que a concentração adicionada de cada um dos restantes compostos na solução base se manteve constante, procedemos ao cálculo do valor médio de todas as determinação e respectivo intervalo de confiança. Para cada composto resultaram 25 determinações, independentemente da concentração de 1-Oct variar de 23,4 a 210,6 µg/L.

Estes resultados podem explicar a existência de discrepâncias entre a análise sensorial de determinado composto e a sua quantificação por HS-SPME, seja por ser detectado sensorialmente e não haver um resultado analítico que explique o aroma, quer por não ser detectado sensorialmente e o resultado encontrado por HS-SPME ser superior ao seu

LPS, uma vez que o 1-Oct faz parte da composição química, quer dos vinhos quer da cortiça, em quantidades que variam entre 3 e 250 µg/L.

Globalmente, a variação do 1-Oct causa interferência negativa na quantificação do Gua, MIB, TCA e Geo, levando a um erro de quantificação por defeito, interferência positiva para o 3-MB, levando a um erro de quantificação por excesso. Relativamente ao 1-Oct-3 não se verifica interferência do 1-Oct na sua quantificação.

Para o 3-MB, sendo a concentração na solução base de 95,4 mg/L os resultados obtidos indicam valores de $(111,7 \pm 14,8)$ mg/L. O valor resultante é sobre-estimado em *ca.* de 17%, com valores entre 96,9 e 126,5 mg/L. Encontram-se sempre valores estimados superiores à quantidade adicionada, o que indica que mesmo que o 3-MB esteja presente em quantidade inferior ao seu LPS (300 mg/L), a interferência do 1-Oct leva à quantificação deste composto em valores superiores ao seu LPS sem haver detecção sensorial. O coeficiente de variação global dos resultados é de 13,8%.

Para o 1-Oct-3 não há influência significativa para os resultados, o que é evidenciado pelos resultados obtidos para a concentração estimada. Assim para um valor de concentração adicionado de 26,7 µg/L, procedemos à determinação de $(26,8 \pm 0,45)$ µg/L, o que é uma muito boa estimativa da concentração na solução base e é independente da variação da concentração do 1-Oct. O coeficiente de variação global dos resultados é de 2,7%.

Para o Gua, sendo a concentração na solução base de 19,4 µg/L os resultados obtidos indicam valores de $(22,9 \pm 7,5)$ µg/L. O valor resultante é sobre-estimado em *ca.* de 18%, com valores entre 15,4 e 30,4 µg/L. No entanto, dado o seu limite de percepção sensorial (20 µg/L), a interferência do 1-Oct pode causar uma diminuição no valor de quantificação do Gua a níveis que não explicam a sua detecção sensorial. O coeficiente de variação global dos resultados é de 39,5%.

Para o MIB, sendo a concentração na solução base de 30 ng/L os resultados obtidos indicam valores de $(28,3 \pm 12,4)$ ng/L. O valor resultante é sub-estimado em *ca.* de 6%, com valores entre 15,9 e 44,2 ng/L. No entanto, dado o seu limite de percepção sensorial (30 ng/L), a interferência do 1-Oct pode causar uma diminuição no valor de quantificação do MIB a níveis que não explicam a sua detecção sensorial. O coeficiente de variação global dos resultados é de 53,7%.

Para o TCA, sendo a concentração na solução base de 7,4 ng/L os resultados obtidos indicam valores de $(6,8 \pm 4,8)$ ng/L. O valor resultante é sub-estimado em *ca.* de 9%, com valores entre 2,0 e 8,8 ng/L. Além do erro de determinação, dado o seu limite de percepção sensorial (4 ng/L), a interferência do 1-Oct pode causar uma diminuição no valor de quantificação do TCA a níveis que não explicam a sua detecção sensorial. O coeficiente de variação global dos resultados é de 67,1%.

Para a Geo, sendo a concentração na solução base de 31,4 ng/L os resultados obtidos indicam valores de $(28,2 \pm 15,1)$ ng/L. O valor resultante é sub-estimado em *ca.* de 10%, com valores entre 15,1 e 41,3 ng/L. No entanto, dado o seu limite de percepção sensorial (25 ng/L), a interferência do 1-Oct pode causar uma diminuição no valor de quantificação da Geo a níveis que não explicam a sua detecção sensorial. O coeficiente de variação global dos resultados é de 62,2%.

De acordo com o coeficiente de variação, podemos dividir os compostos influenciados pela variação de concentração do 1-Oct em 3 grupos: Grupo A, constituído pelo TCA, MIB e Geo, com coeficientes de variação de 67,1, 62,2 e 53,7%, respectivamente; Grupo B, constituído pelo Gua, com coeficiente de variação de 39,5% e o Grupo C, constituído pelo 3-MB, com coeficiente de variação de 13,8%.

Verifica-se que o comportamento dos compostos seguiu a mesma tendência de agrupamento que a observada no estudo dos Factores Relativos de Resposta (ponto 3.3), verificando-se que, com excepção para o 3-MB, a variabilidade associada à interferência de um composto por HS-SPME está igualmente relacionada com os FRR, sendo inversamente proporcional ao seu $\text{Log}(\text{FRR})$.

Verifica-se assim que quantificação de compostos por HS-SPME é sensível à interferência de compostos presentes na matriz com FRR mais elevado. Este efeito reveste-se de elevada importância na quantificação de TCA, MIB e Geo, que apesar de apresentarem um erro por sub-estimativa entre 6 e 10%, têm um coeficiente de variação de tal maneira elevado (entre 50 e 70%) que leva a que os valores de quantificação destes compostos possam ser de tal forma diminuídos em relação à sua real concentração na matriz, que estes sejam detectados sensorialmente e não detectados por HS-SPME.

3.4.1.4. Estudo do efeito da variação da concentração do guaiaicol

Partindo da solução base, foram efectuadas variações da concentração do Gua (0,3 a 2,7 vezes), mantendo-se os restantes compostos com concentração constante. Na Tabela 27 apresenta-se, para cada composto, a razão entre A_x/A_0 , sendo A_x a área do composto i na solução em que ocorre variação da concentração de Gua e A_0 a área do mesmo composto na solução base.

Tabela 27. Efeitos de interferência da concentração do guaiaicol sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz (n=25).

Variação de concentração (x)	3-MB	1-Oct-3	1-Oct	MIB	TCA	Geo
0,3	1,018*	0,976	0,959	1,005	1,019	1,010
0,7	1,036	1,013	1,034	0,994	0,999	1,032
2,0	1,027	1,034	1,012	1,018	1,041	1,008
2,7	0,089	0,952	1,040	0,986	1,014	0,992

(x) Factor de variação em relação à concentração da solução base (19,4 µg/L).

* Razão entre A_x/A_0 , sendo A_x a área do composto i na solução em que ocorre variação da concentração de Gua e A_0 a área do mesmo composto na solução base.

A aplicação do teste t -Student aos dados anteriores indica que não há diferença significativa entre os valores de A_0 e A_x , com 95% de confiança. Assim, a variação na concentração do Gua não interfere na quantificação dos outros compostos, nas gamas de concentração em estudo.

3.4.1.5. Estudo do efeito da variação da concentração do 2-metilisoborneol

Partindo da solução base, foram efectuadas variações da concentração do MIB (0,3 a 2,7 vezes), mantendo-se os restantes compostos com concentração constante. Na Tabela 28 apresenta-se, para cada composto, a razão entre A_x/A_0 , sendo A_x a área do composto i na solução em que ocorre variação da concentração de MIB e A_0 a área do mesmo composto na solução base.

Tabela 28. Efeitos de interferência da concentração do 2-metilisoborneol sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz (n=25).

Varição de concentração (x)	3-MB	1-Oct-3	1-Oct	Gua	TCA	Geo
0,3	1,001*	1,003	1,020	1,006	1,003	0,960
0,7	1,028	0,985	1,056	0,998	0,992	0,968
2,0	1,016	0,994	0,988	0,978	0,990	1,007
2,7	1,033	0,993	0,991	0,987	0,987	0,984

(x) Factor de variação em relação à concentração da solução base (30 ng/L).

* Razão entre A_x/A_0 , sendo A_x a área do composto i na solução em que ocorre variação da concentração de MIB e A_0 a área do mesmo composto na solução base.

A aplicação do teste t -Student aos dados anteriores indica que não há diferença significativa entre os valores de A_0 e A_x , com 95% de confiança. Assim, a variação na concentração do MIB não interfere na quantificação dos outros compostos, nas gamas de concentração em estudo.

3.4.1.6. Estudo do efeito da variação da concentração do 2,4,6-tricloroanisole

Partindo da solução base, foram efectuadas variações da concentração do TCA (0,3 a 2,7 vezes), mantendo-se os restantes compostos com concentração constante. Na Tabela 29 apresenta-se, para cada composto, a razão entre A_x/A_0 , sendo A_x a área do composto i na solução em que ocorre variação da concentração de TCA e A_0 a área do mesmo composto na solução base.

Tabela 29. Efeitos de interferência da concentração do 2,4,6-tricloroanisole sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz (n=25).

Varição de concentração (x)	3-MB	1-Oct-3	1-Oct	Gua	MIB	Geo
0,3	1,012*	0,977	0,987	0,950	0,957	1,029
0,7	0,993	0,963	1,031	0,984	1,013	1,018
2,0	1,004	1,009	0,984	0,976	0,905	1,050
2,7	1,011	0,963	0,994	0,983	0,996	1,003

(x) Factor de variação em relação à concentração da solução base (7,4 ng/L).

* Razão entre A_x/A_0 , sendo A_x a área do composto i na solução em que ocorre variação da concentração de TCA e A_0 a área do mesmo composto na solução base.

A aplicação do teste *t*-Student aos dados anteriores indica que não há diferença significativa entre os valores de A_0 e A_x , com 95% de confiança. Assim, a variação na concentração do TCA não interfere na quantificação dos outros compostos, nas gamas de concentração em estudo.

3.4.1.7. Estudo do efeito da variação da concentração da geosmina

Partindo da solução base, foram efectuadas variações da concentração da Geo (0,3 a 2,7 vezes), mantendo-se os restantes compostos com concentração constante. Na Tabela 30 apresenta-se, para cada composto, a razão entre A_x/A_0 , sendo A_x a área do composto *i* na solução em que ocorre variação da concentração de Geo e A_0 a área do mesmo composto na solução base.

A aplicação do teste *t*-Student aos dados anteriores indica que não há diferença significativa entre os valores de A_0 e A_x , com 95% de confiança. Assim, a variação na concentração da Geo não interfere na quantificação dos outros compostos, nas gamas de concentração em estudo.

Tabela 30. Efeitos de interferência da concentração do geosmina sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz (n=25).

Varição de concentração (x)	3-MB	1-Oct-3	1-Oct	Gua	MIB	TCA
0,3	1,012*	0,986	0,982	1,002	0,961	1,024
0,7	1,044	1,009	0,972	0,968	0,985	1,004
2,0	0,995	0,980	0,977	0,995	0,959	1,005
2,7	1,031	0,983	0,975	1,000	0,972	1,024

(x) Factor de variação em relação à concentração da solução base (31,4 ng/L).

* Razão entre A_x/A_0 , sendo A_x a área do composto *i* na solução em que ocorre variação da concentração de Geo e A_0 a área do mesmo composto na solução base.

3.4.1.8. Resumo

De forma global, e relativamente aos compostos em estudo, o 1-Oct é o único que apresenta um efeito significativo na diminuição da eficácia da extracção dos compostos,

com excepção do 1-Oct-3, causando assim uma diminuição acentuada da sensibilidade da extracção. Os compostos influenciados são aqueles que apresentam menores FRR, indicando que os compostos com maior Log(FRR) são menos influenciados por efeitos de composição de matriz.

Verifica-se assim que quantificação de compostos por HS-SPME é sensível à interferência de compostos presentes na matriz com FRR mais elevado. Este efeito reveste-se de elevada importância na quantificação de TCA, MIB e Geo, que apesar de apresentarem um erro por sub-estimativa entre 6 e 10%, têm um coeficiente de variação elevado (entre 50 e 70%) que leva a que os valores de quantificação destes compostos possam ser de tal forma diminuídos em relação à sua real concentração na matriz, que estes sejam detectados sensorialmente e não detectados por HS-SPME.

Este facto reforça estudos anteriores que indicavam que a quantificação por SPME é muito dependente da composição da matriz, sendo de considerar que a composição relativa da matriz deve ser considerada quando se comparam valores obtidos com esta metodologia⁵¹.

3.4.2. Análise do efeito da variação da concentração dos compostos constituintes da matriz sobre a área individual de cada um dos compostos

O objectivo da análise de regressão é descrever a relação entre variáveis de forma a obter um valor estimado da resposta. Neste caso as variáveis são a concentração de cada um dos compostos e a resposta é a área cromatográfica de um dado composto. Assim sendo, os resultados estão sempre dependentes da qualidade da amostra, nomeadamente a variabilidade de cada composto, que deve ser comparável com aquele que se pensa encontrar nas amostras reais, de forma a diminuir o erro da estimativa dos efeitos.

De seguida apresentam-se os modelos estatísticos desenvolvidos para cada um dos compostos com um nível de confiança de 95%, cujos resultados se encontram em anexo. Os compostos encontram-se referidos pelas letras A, B, C, D, E, F, G, seguindo a ordem de eluição, ou seja 3-MB, 1-Oct-3, 1-Oct, Gua, MIB, TCA e Geo, respectivamente. Para cada um dos compostos, quanto maior for o valor de significância (p), maior será a influência da concentração desse compostos nas áreas cromatográficas. Os modelos

propostos permitem conhecer a tendência do efeito positivo ou negativo da variação da concentração sobre a área cromatográfica do composto em estudo.

3.4.2.1. Modelo de regressão proposto para o 3-metil-1-butanol (A)

A equação do modelo linear proposto para o 3-MB é a seguinte:

$$\hat{Y}_A = 17291984 + 30133C_A + 4841C_B + 52903C_C - 46407C_D - 6810C_E - 17500C_F - 4927C_G$$

($p=0,07$) ($p=0,49$) ($p=0,98$) ($p=0,10$) ($p=0,72$) ($p=0,68$) ($p=0,72$) ($p=0,76$)

De acordo com o modelo linear proposto, verifica-se que a variação da concentração de todos os compostos (A a G) influencia a área cromatográfica do 3-MB. De forma positiva tem-se a contribuição do próprio 3-MB e ainda de 1-Oct-3 e 1-Oct. Têm-se contribuições negativas do Gua, MIB, TCA e Geo. Verifica-se que a significância do efeito da variação da concentração do próprio composto na área cromatográfica é baixa ($p=0,49$), o que deverá estar associado à grande variabilidade dos dados obtidos para este composto. O 1-Oct com $p=0,10$ é o composto cuja variação da concentração tem um efeito mais significativo sobre a área cromatográfica do 3-MB.

3.4.2.2. Modelo de regressão proposto para o 1-octeno-3-ol (B)

A equação do modelo linear proposto para o 1-Oct-3 é a seguinte:

$$\hat{Y}_B = 860855 + 13567C_A + 132026C_B + 16242C_C + 78912C_D - 8955C_E - 25408C_F - 8382C_G$$

($p=0,75$) ($p=0,28$) ($p=0,04$) ($p=0,08$) ($p=0,04$) ($p=0,06$) ($p=0,07$) ($p=0,07$)

De acordo com o modelo linear proposto, verifica-se que a variação da concentração de todos os compostos (A a G) influencia a área cromatográfica do 1-Oct-3. De forma positiva tem-se a contribuição do próprio 1-Oct-3 e ainda do 3-MB, 1-Oct e Gua. Têm-se contribuições negativas do MIB, TCA e Geo. Verifica-se que a significância do efeito da variação da concentração do próprio composto na área cromatográfica é moderada ($p=0,04$). O Gua com $p=0,04$ é o composto cuja variação da concentração tem um efeito igualmente significativo sobre a área cromatográfica do 1-Oct-3.

3.4.2.3. Modelo de regressão proposto para o 1-octanol (C)

A equação do modelo linear proposto para o 1-Oct é a seguinte:

$$\hat{Y}_C = 21321948 - 23743C_A - 148437C_B + 158284C_C + 63132C_D + 1426C_E + 12648C_F + 4168C_G$$

($p < 0,01$) ($p = 0,16$) ($p = 0,08$) ($p < 0,01$) ($p = 0,21$) ($p = 0,82$) ($p = 0,49$) ($p = 0,50$)

De acordo com o modelo linear proposto, verifica-se que a variação da concentração de todos os compostos (A a G) influencia a área cromatográfica do 1-Oct. De forma positiva tem-se a contribuição do próprio 1-Oct e ainda do Gua, do MIB, do TCA e da Geo. Têm-se contribuições negativas do 3-MB e do 1-Oct-3. Verifica-se que a significância do efeito da variação da concentração do próprio composto na área cromatográfica é elevada ($p < 0,01$). A variação da concentração dos outros compostos tem um efeito pouco significativo sobre a área cromatográfica do 1-Oct.

3.4.2.4. Modelo de regressão proposto para o guaiacol (D)

A equação do modelo linear proposto para o Gua é a seguinte:

$$\hat{Y}_D = 1998030 + 42C_A - 2941C_B - 8946C_C + 66784C_D + 55C_E + 532C_F + 266C_G$$

($p < 0,01$) ($p = 0,98$) ($p = 0,74$) ($p < 0,01$) ($p < 0,01$) ($p = 0,94$) ($p = 0,79$) ($p = 0,68$)

De acordo com o modelo linear proposto, verifica-se que a variação da concentração de todos os compostos (A a G) influencia a área cromatográfica do Gua. De forma positiva tem-se a contribuição do próprio Gua e ainda do 3-MB, do MIB, do TCA e da Geo. Têm-se contribuições negativas do 1-Oct-3 e do 1-Oct. Verifica-se que a significância do efeito da variação da concentração do próprio composto na área cromatográfica é elevada ($p < 0,01$). A variação da concentração do 1-Oct ($p < 0,01$) tem igualmente um efeito significativo sobre a área cromatográfica do Gua.

3.4.2.5. Modelo de regressão proposto para o 2-metilisoborneol (E)

A equação do modelo linear proposto para o MIB é a seguinte:

$$\hat{Y}_E = 636732 + 40C_A - 1193C_B - 2070C_C + 58C_D + 1547C_E - 406C_F - 64C_G$$

($p < 0,01$) ($p = 0,87$) ($p = 0,34$) ($p < 0,01$) ($p = 0,94$) ($p < 0,01$) ($p = 0,14$) ($p = 0,48$)

De acordo com o modelo linear proposto, verifica-se que a variação da concentração de todos os compostos (A a G) influencia a área cromatográfica do MIB. De forma positiva tem-se a contribuição do próprio MIB e ainda do 3-MB. Têm-se contribuições negativas do 1-Oct-3, do 1-Oct, do TCA e da Geo. Verifica-se que a significância do efeito da variação da concentração do próprio composto na área cromatográfica é elevada ($p < 0,01$). A variação da concentração do 1-Oct ($p < 0,01$) tem igualmente um efeito significativo sobre a área cromatográfica do MIB.

3.4.2.6. Modelo de regressão proposto para o 2,4,6-tricloroanisole (F)

A equação do modelo linear proposto para o TCA é a seguinte:

$$\hat{Y}_F = 77607 - 21C_A - 80C_B - 554C_C - 62C_D - 16C_E + 1406C_F - 16C_G$$

($p < 0,01$) ($p = 0,73$) ($p = 0,79$) ($p < 0,01$) ($p = 0,72$) ($p = 0,47$) ($p < 0,01$) ($p = 0,45$)

De acordo com o modelo linear proposto, verifica-se que a variação da concentração de todos os compostos (A a G) influencia a área cromatográfica do TCA. De forma positiva tem-se unicamente a contribuição do próprio TCA. Têm-se contribuições negativas dos restantes compostos em estudo. Verifica-se que a significância do efeito da variação da concentração do próprio composto na área cromatográfica é elevada ($p < 0,01$). A variação da concentração do 1-Oct ($p < 0,01$) tem igualmente um efeito significativo sobre a área cromatográfica do TCA.

3.4.2.7. Modelo de regressão proposto para a geosmina (G)

A equação do modelo linear proposto para a Geo é a seguinte:

$$\hat{Y}_G = 385091 - 201C_A - 1092C_B - 710C_C - 512C_D - 37C_E - 167C_F + 660C_G$$

($p < 0,01$) ($p = 0,30$) ($p = 0,25$) ($p < 0,01$) ($p = 0,36$) ($p = 0,61$) ($p = 0,43$) ($p < 0,01$)

De acordo com o modelo linear proposto, verifica-se que a variação da concentração de todos os compostos (A a G) influencia a área cromatográfica da Geo. De forma positiva tem-se unicamente a contribuição da própria Geo. Têm-se contribuições negativas dos restantes compostos em estudo. Verifica-se que a significância do efeito da variação da concentração do próprio composto na área cromatográfica é elevada ($p < 0,01$). A variação da concentração do 1-Oct ($p < 0,01$) tem igualmente um efeito significativo sobre a área cromatográfica da Geo.

3.4.2.8. Resumo

Este estudo particular, efectuado em soluções-modelo, e uma vez que não existem na literatura dados sobre a variabilidade dos mesmos nos produtos naturais, ou seja no vinho e na cortiça, representa unicamente um modelo para as gamas de concentração e tipos de compostos estudados, a sua aplicabilidade a amostras reais deve ser acompanhada da verificação da gama de concentração relativa dos compostos estudados.

Globalmente, verifica-se que o 3-MB apresenta elevada variabilidade, o que limita a observação dos efeitos dos outros compostos. No entanto o 1-Oct tem um efeito positivo sobre a área cromatográfica do 3-MB. O 1-Oct tem um efeito negativo sobre o Gua, o MIB, o TCA e a Geo. Este pode estar relacionado com a alteração das condições do espaço de cabeça e posterior sorção pela fibra, evidenciado pelo maior Log(FRR) do 1-Oct. O 1-Oct-3 é influenciado de forma positiva pelo 1-Oct e Gua.

Assim, e de acordo com os dados obtidos e os modelos propostos, verifica-se que as áreas cromatográficas do Gua, MIB, TCA e Geo são afectadas de forma negativa pela concentração de 1-Oct na matriz. A quantificação destes compostos é assim, dependente da quantidade de 1-Oct presente.

A análise do efeito da variação da concentração dos compostos constituintes da matriz sobre a área individual de cada um dos compostos através de análise de regressão permite analisar a influência simultânea de todas as variáveis independentes (concentração dos compostos presentes na matriz) sendo por isso mais sensível à análise de vários interferentes em simultâneo.

Os resultados obtidos por esta metodologia estão de acordo com os resultados obtidos através da análise do efeito da variação individual da concentração de cada um dos compostos sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz (3.4.1.).

3.5. Pesquisa dos compostos padrão nos simulantes de vinho rolhados com cortiça N, B e MA

Procedeu-se à pesquisa dos sete compostos em estudo em simulantes de vinho rolhados com os três tipos de cortiça. Os compostos em estudo foram pesquisados em modo SIM, através dos iões mais abundantes (Tabela 14), verificando se estariam eventualmente presentes no tempo de retenção previsto, confirmando a detecção com análise do espectro de massa do composto suspeito em relação ao obtido para o composto padrão. A quantificação foi efectuada a partir das curvas de calibração previamente preparadas (Tabela 20).

Não foi identificada a presença de 3-MB, 1-Oct-3, 1-Oct, MIB nem Geo. O TCA foi assim o único composto identificado, sendo a sua concentração estimada de 0,6, 0,4 e 2,4 ng/L para a cortiça N, B e MA, respectivamente, com uma proporção relativa de N:B:MA de 1:0,7:4 (Tabela 31).

Tabela 31. Concentração dos compostos padrão estudados em simulantes de vinho rolhados com cortiça normal (N), bolor (B) e mancha amarela (MA) (n= 60).

Composto	Concentrações (ng/L)		
	N	B	MA
3-MB	Nd*	Nd	Nd
1-Oct-3	Nd	Nd	Nd
1-Oct	Nd	Nd	Nd
Gua	Nd	Nd	Nd
MIB	Nd	Nd	Nd
TCA	0,6 (193,9)**	0,4 (152,6)	2,4 (87,4)
Geo	Nd	Nd	Nd

* Nd: Não detectado

** Coeficiente de variação (%)

Existem 2 estudos publicados relativamente à análise de compostos voláteis e TCA em cortiça e TCA que migra para o vinho, dos tipos de cortiça N, B e MA.

De acordo com estudos de Rocha *et al.*²⁰ na análise de extractos de cortiça por SDE com *n*-pentano, encontrou 3-MB, 1-Oct e Gua nos 3 tipos de cortiça, MIB e TCA em cortiça B e MA, 1-Oct-3 unicamente em cortiça MA e ausência de Geo. A proporção de TCA nos diferentes tipos de cortiça é 0:4:1 (N:B:MA).

De acordo com estudos de Juanola *et al.*³⁶, tanto nas cortiças, analisadas por extracção com *n*-pentano, como no vinho rolhado com os 3 tipos de cortiças, analisado por HS-SPME, a maior quantidade de TCA ocorre na cortiça B, seguindo-se na MA e por fim na N. Analisando a sua proporção relativa nos diferentes tipos de cortiça, N:B:MA, verifica-se uma relação de 1:38:3 para o TCA presente nas rolhas e 1:15:3 para o TCA que migra para o vinho (Tabela 32).

Tabela 32. Concentração do 2,4,6-tricloroanisole em cortiça normal (N), bolor (B) e mancha amarela (MA), que migrou para vinho branco³⁶.

Matriz	Concentração (ng/L)		
	N	B	MA
Rolhas* (µg/kg)	0,7	26,4	1,9
Vinho** (ng/L)	2,5	38,5	6,4

* Análise das rolhas individualmente por extracção com *n*-pentano

** Análise do vinho por HS-SPME com PDMS.

Em termos absolutos, e uma vez que as metodologias de extracção da cortiça destes autores são diferentes (maior quantidade de amostras e solvente), os resultados não podem ser directamente comparados. Relativamente à proporção de TCA obtida nos 3 tipos de cortiça, enquanto que para as cortiças N e MA se podem considerar os resultados similares, para a cortiça B verificam-se tendências diferentes. A explicação para este desfasamento, e uma vez que a causa principal para o aparecimento do TCA

está associada ao facto de se tratar de um metabolito secundário de microrganismos, pode ser devida à forma de preparação das amostras deste tipo de cortiça (B). De facto, a microflora da cortiça é muito variável, ocorrendo fenómenos de competição e sinergismo, que levam ao desenvolvimento de determinadas espécies em detrimento de outras. Assim, e uma vez que não houve controlo nem estudos sobre o tipo de microflora presente em cada um dos casos, consoante as espécies de microrganismos presentes ocorrerá a formação de diferentes metabolitos secundários. Este motivo, associado à diferença de metodologias de extracção de Rocha *et al.*, pode ser a causa para o facto de não terem sido encontrados outros compostos além do TCA, pois são todos indicados como metabolitos secundários de microrganismos.

O coeficiente de variação (Tabela 31) é menor para a cortiça MA (87,4%) seguindo-se a cortiça B (152,6%) e finalmente a cortiça N (193,9%). Esta variabilidade, encontrada em anteriores estudos de quantificação de TCA^{25,36}, está relacionada com o facto de o cálculo do desvio padrão entrar em consideração com os resultados considerados nulos, aumentando assim a variabilidade em relação ao valor médio das 20 réplicas. Se analisarmos os dados em relação ao número de réplicas com detecção de TCA (Tabela 33), verificamos que em 25% dos simulantes rolhados com cortiça N é detectada a presença de TCA, sendo o valor médio encontrado para as 5 réplicas de 2,3 ng/L, com um coeficiente de variação de 29,0%, em 35% das réplicas de simulantes rolhados com cortiça B foi detectado TCA, com um correspondente valor médio de 1,2 ng/L e coeficiente de variação de 29,2% e finalmente, para os simulantes rolhados com cortiça MA, foi encontrado TCA em 65% das réplicas, com um valor médio de 3,9 ng/L e um coeficiente de variação de 27,5%. Verifica-se assim que se considerarmos unicamente as réplicas com detecção do composto, a variabilidade da sua concentração é muito menor que o valor calculado para a globalidade das réplicas, sendo equivalente para todos os tipos de cortiça. A proporção relativa nas amostras com detecção de TCA, N:B:MA é equivalente (1:0,5:2) ao valor médio obtido para a média das 20 réplicas.

Relativamente ao impacto da presença do TCA nos simulantes de vinho, pode-se comparar, para os diferentes tipos de cortiça, o número de réplicas susceptíveis de ser classificadas com defeito organoléptico, ou seja, com valores de TCA acima do seu LPS (4 ng/L). Para os simulantes rolhados com cortiça N e B nenhuma das réplicas apresenta valores acima do LPS pelo que nenhum dos simulantes seria susceptível de apresentar defeitos de aroma associados aos descritores de aroma dos sete compostos estudados.

No caso dos simulantes rolhados com cortiça MA, verifica-se que 35% apresentam resultados acima do LPS, indicando que 35% destes simulantes são susceptíveis de apresentar defeito de aroma.

Tabela 33. Concentração de 2,4,6-tricloroanisole nos simulantes de vinho rolhados com cortiça normal (N), bolor (B) e mancha amarela (MA) (n= 60).

Tipo de cortiça	Concentração (ng/L)			Nº de réplicas com detecção TCA	Nº de réplicas acima do LPS
	Média	Mínimo	Máximo		
normal (N)	0,6*	0,0	3,2	5	0
bolor (B)	0,4*	0,0	1,5	7	0
mancha amarela (MA)	2,4*	0,0	5,4	13	7

* Média das réplicas em que foi detectado o TCA.

LPS: Limite de percepção sensorial (4 ng/L).

Parte IV

Conclusões

Os estudos efectuados permitiram concluir que a eficiência de extracção da técnica de HS-SPME e a reprodutibilidade dos resultados obtidos são bastante influenciados pelas condições experimentais utilizadas, e dependem das características físico-químicas dos compostos, como a solubilidade em água, volatilidade, pressão de vapor e coeficiente de partição fase líquida vs fase gasosa, bem como da composição da matriz.

O aumento da temperatura de extracção pode causar efeitos ao nível da quantidade extraída por HS-SPME, da variabilidade das determinações e da sensibilidade e linearidade da metodologia. Assim, para o grupo de compostos estudados, o aumento de temperatura (de 30 para 50°C), conduz a um aumento de 48% da quantidade extraída para compostos mais voláteis, tal como observado para o 3-MIB, mas, para compostos com elevado coeficiente de partição fase líquida/fase gasosa como o TCA, ocorre uma diminuição de 32% da quantidade extraída com o aumento da temperatura. Verifica-se também um aumento significativo do coeficiente de variação dos resultados analíticos, e uma diminuição da linearidade da resposta com o aumento da temperatura

Concluiu-se assim que das condições experimentais testadas, a temperatura de extracção de 30°C é a que permite as melhores condições de reprodutibilidade e linearidade.

O estudo da linearidade global de resposta da fibra permitiu verificar que as áreas cromatográficas totais variam de forma linear ($R^2=0,9788$) com a concentração total da matriz. Devido ao facto dos padrões utilizados estarem presentes em gamas de concentração muito distintas e sendo o 3-MB o composto presente em concentração mais elevada, é de realçar que estas áreas cromatográficas totais estão dependentes principalmente deste composto. Estes resultados demonstram que, para concentrações totais entre 41,5 e 275,2 mg/L, não se verifica saturação da fase estacionária.

O estudo das condições de reprodutibilidade e linearidade da metodologia HS-SPME desenvolvida para cada um dos compostos, usando soluções padrão preparadas em simulantes de vinho seguindo os limites de percepção sensorial (LPS) dos compostos permitiu obter coeficientes de variação entre 3,2 e 8,8%, e respostas lineares com coeficientes de correlação (R^2) entre 0,9516 e 0,9886.

O agrupamento dos compostos de acordo com os respectivos valores de Log(FRR) levou à constituição de quatro grupos de compostos. No primeiro grupo, com Log(FRR)=1,

encontra-se o 3-MB, com menor massa molecular, volatilidade e solubilidade em água elevadas. No grupo 2, com Log(FRR) entre 2 e 3, encontram-se os compostos com menor volatilidade que o 3-MB, o que faz com que possam necessitar um tempo mais longo para que ocorra a sua transferência para a fase gasosa. Estes compostos apresentam baixa solubilidade em água, e os valores de $\text{LogP(oct/ag)} \approx 4$ indicam alguma solubilidade em solventes orgânicos; Assim, o valor de log(FRR) determinado para este grupo pode ser explicado pela presença do etanol como co-solvente, conjugado com a sua baixa volatilidade. No grupo 3 encontra-se o Gua, com $\text{Log(FRR)}=4$, um composto mais volátil e mais solúvel que os compostos do grupo anterior. Neste caso, do equilíbrio entre o efeito da volatilidade vs solubilidade, parece ser a volatilidade o efeito preponderante, o que se traduz por um valor relativamente elevado de Log(FRR) . No grupo 4, com $\text{Log(FRR)}>4$, encontram-se o 1-Oct-3 e o 1-Oct, compostos com maior afinidade para a fase gasosa, evidenciada por terem valores de solubilidade em água relativamente baixa.

A avaliação dos efeitos de interferência da concentração de cada composto sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz indica que se verifica um efeito significativo da variação da concentração do 1-Oct sobre as áreas cromatográficas dos restantes compostos da matriz, com excepção do 1-Oct-3. Este efeito ocorre de forma positiva para o 3-MB e negativa para o Gua, MIB, TCA e Geo. O 1-Oct apresenta o maior valor de Log(FRR) (4,9), e causa interferência em todos os compostos com valores de Log(FRR) menores mas não naquele que tem um valor de Log(FRR) próximo do seu, no caso o 1-Oct-3 ($\text{Log(FRR)}= 4,3$).

Uma vez que o 1-Oct faz parte da composição química, quer dos vinhos quer da cortiça, em quantidades que variam entre 3 e 250 $\mu\text{g/L}$ estes resultados podem explicar a existência de discrepâncias entre a análise sensorial de determinado composto e a sua quantificação por HS-SPME, seja por ser detectado sensorialmente e não haver um resultado analítico que explique o aroma, quer por não ser detectado sensorialmente e o resultado encontrado por HS-SPME ser superior ao seu LPS.

De acordo com o coeficiente de variação, podem-se dividir os compostos cuja quantificação sofre interferências pela variação de concentração do 1-Oct em 3 grupos: Grupo A, constituído pelo MIB, TCA e Geo, com coeficientes de variação de 53,7, 67,1 e 62,2%, respectivamente; Grupo B, constituído pelo Gua, com coeficiente de variação de 39,5% e o Grupo C, constituído pelo 3-MB, com coeficiente de variação de 13,8%.

Verifica-se que o comportamento dos compostos face à variação da concentração de 1-Oct seguiu a mesma tendência de agrupamento que a observada no estudo dos valores de Log(FRR), verificando-se que, com excepção para o 3-MB, a variabilidade associada à interferência de um composto por HS-SPME está relacionada com a afinidade para a fase estacionária, sendo inversamente proporcional ao seu valor de Log(FRR).

Finalmente, a pesquisa dos compostos padrão em simulantes de vinho rolhados com cortiça normal (N), e com bolores (B) e mancha amarela (MA), não permitiu detectar a presença de 3-MB, 1-Oct-3, 1-Oct, MIB nem Geo. O TCA foi o único composto identificado com concentrações 0,6, 0,4 e 2,4 ng/L para a cortiça N, B e MA, respectivamente, com uma proporção relativa de N:B:MA de 1:0,7:4.

Verifica-se que todos os valores determinados das cortiças N e B se encontravam abaixo do LPS do TCA (4 ng/L). Estes resultados indicam que nenhum dos simulantes rolhados com cortiça N e B seria susceptível de apresentar defeitos de aroma associados aos descritores de aroma dos sete compostos estudados. Os valores encontrados para a cortiça MA indicam que, com esta cortiça, 35% dos simulantes de vinho apresentavam valores de TCA superiores ao seu LPS. Assim, 35 % dos simulantes rolhados com cortiça MA são susceptíveis de apresentar defeitos de aroma.

Parte V

Bibliografia

- 1 Gil, L. (2000) *História da Cortiça*. S.M.Lamas, Ed. APCOR.
- 2 Silva Pereira, C.; Danesh, P.; Marques, J.J.F.; San Romão, M.V. (1999) O gosto a rolha em vinhos. Estado actual dos conhecimentos. *Ciência Téc. Vitiv.*, 14, 2, 79-99.
- 3 Rocha, S. (1997) Estudo da composição química, da estrutura celular e dos componentes voláteis da cortiça de *Quercus suber* L.. I- Em função de ataques microbiológicos. II- Em função do processo de autoclavagem. Tese de doutoramento, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Portugal.
- 4 Chatonnet, P.; Labadie, D. (1995) Contamination des locaux vinicoles et altération des vins- contrôle de la qualité de l'atmosphère des chais. *Rev. Oenologues*, 74, 19-21.
- 5 Chatonnet, P.; Boutou, S.; Labadie, D. (2003) Dosage simultané des chlorophénols et des chloroanisoles dans les vins et les obturateurs en liège ou à base de liège- Application à la détermination de l'origine de la pollution des vins en bouteille. *J. Inter. Sci. Vigne Vin*, 37, 181-193.
- 6 Pawliszyn, J. (2000) Theory of solid phase micro-extraction. *J. Chromatogr. Sci.*, 38, 270-278.
- 7 Zhang, Z.; Pawliszyn, J. (1999) Headspace solid phase microextraction. *Anal. Chem.*, 65, 1843-1852.
- 8 Fortes, M.A.; Rosa, E.; Pereira, H. (2004) *A Cortiça*, Lisboa, IST, Instituto Superior Técnico Press.
- 9 Neto, P.V. (1994) *Cortiça. Tecnologia Corticeira - 1ªano*. Lisboa, Coleção aprendizagem profissional. Edição IEFP.
- 10 Mendes, A. (2003) *A economia do sector da cortiça em Portugal. Evolução das actividades de produção e transformação ao longo dos séculos XIX e XX*. Universidade de Aveiro, XXII Encontro da Ass. Port. História Económica e Social.
- 11 Anónimo (2002) *Código Internacional de Práticas Rolheiras*. 4ªEd. Paris, Ed. Celiège.
- 12 Rocha, S.M.; Coimbra, M.A.; Delgadillo, I. (2000) Demonstration of pectic polysaccharides in cork cell wall from *Quercus suber* L.. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2003-2007.

- 13 Cordeiro, N.; Belgacem, M.N.; Silvestre, A.J.D.; Pascoal Neto, C.; Gandini, A. (1998) Cork suberin as a new source of chemicals. 1. Isolation and chemical characterization of its composition. *Int. J. Biol. Macromol.*, 22, 71-80.
- 14 Lopes, M.H.; Sarychev, A.; Pascoal Neto, C.; Gil, A.M. (2000) Spectral editing of ¹³C/MAS NMR spectra of complex systems: application to the structural characterization of cork cell walls. *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 16, 109-121.
- 15 Rocha, S.; Goodfellow, B.; Delgadillo, I.; Pascoal Neto, C.; Gil, A.M. (2001) Enzymatic isolation and structural characterization of polymeric suberin of cork from *Quercus suber* L.. *Int. J. Biol. Macromol.*, 28, 107-119.
- 16 Krizková, L.; Lopes, M.; Polónyi, J.; Belicová, A.; Dobias, J.; Ebringer, L. (1999) Antimutagenicity of a suberin extract from *Quercus suber* cork. *Mutation Res.*, 446, 225-230.
- 17 Duke, J.A. (1992) *Handbook of phytochemical constituents of grass herbs and other economic plants*. Boca Raton, FL. CRC Press.
- 18 Boidron, J.N.; Lefebvre, J.M.; Riboulet, J.M.; Ribéreau-Gayon, P. (1984). Les substances volatiles susceptibles d'être cedes au vin par le bouchon de liège. *Sci. Aliment.*, 4, 609-616.
- 19 Mazzoleni, V.; Caldentey, P.; Careri, M.; Mangia, A.; Colagrande, O. (1994) Volatile components of cork used for production of wine stoppers. *Am. J. Enol. Vitic.*, 45, 401-406.
- 20 Rocha, S.; Delgadillo, I.; Ferrer Correia, A.J. (1996) GC-MS study of volatiles of normal and microbiologically attacked cork from *Quercus suber* L.. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 865-876.
- 21 Augusto, F.; Lopes, A.L.; Zini, C.A. (2003) Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances. *Trends in Anal. Chem.*, 22, 3, 160-169.
- 22 Rocha, S.M.; Coimbra, M.A.; Delgadillo, I. (2004) Occurrence of furfuraldehydes during the processing of *Quercus suber* L. cork. Simultaneous determination of furfural, 5-hydroxymethylfurfural and 5-methylfurfural and their relation with cork polysaccharides. *Carbohydr. Polym.*, 56, 287-293.
- 23 Castola, V.; Marongiu, B.; Bighelli, A.; Floris C.; Lai, A.; Casanova, J. (2005) Extractives of cork (*Quercus suber* L.): chemical composition of dichloromethane and supercritical CO₂ extracts. *Ind. Crops and Prod.*, 21, 65-69.
- 24 Schunuer, J.; Olsson, J.; Borjesson, T. (1999) Fungal volatiles as indicators of food and feeds spoilage. *Fungal Genet. and Biol.*, 27, 209-217.

- 25 Anónimo (1996) *Quercus: Quantitative experiments to determine the components responsible and eliminate the causes of undesirable sensory characteristics in drinks stoppered with cork*. Sta. Maria de Lamas. Ed. CELiège.
- 26 Alvarez-Rodrigues, M.L.; Belloch, C.; Villa, M.; Uruburu, F.; Larriba, G.; Coque, J.J.R. (2003) Degradation of vanillic acid and production of guaiacol by microorganisms isolated from cork samples. *FEMS Microbiol. Lett.*, 220, 49-55.
- 27 Alvarez-Rodriguez, M.L.; López-Ocana, L.; López-Coronado, J.M.; Rodriguez, E.; Martinez, M.J.; Larriba, G.; Coque, J.J. (2002) Cork taint of wines: Role of filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6-trichloroanisole by *O*-methylation of 2,4,6-trichlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5860-5869.
- 28 Anónimo (2001) *Indústria da Cortiça: Manual de Prevenção*. Lisboa Ed. CTCOR/ IDICT.
- 29 Danesh, P.; Marques, J.J.F.; San Romão, M.V. (1997) Mycobiota in Portuguese “normal” and “green” cork throughout the manufacturing process of stopper. *J Appl. Microbiol.*, 82, 689-694.
- 30 Coque, J.J.; Alvarez-Rodriguez, M.L.; Larriba, G. (2003) Characterization of an inducible chlorophenol *O*-methyltransferase from *Trichoderma longibrachiatum* involved in the formation of chloroanisoles and determination of its role in cork taint of wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 5089-5095.
- 31 Soleas, G.J.; Yan, J.; Seaver, T.; Goldberg, D.M. (2002) Method for the gas chromatographic assay with mass selective detection of trichloro compounds in corks and wines applied to elucidate the potential of cork taint. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1032-1039.
- 32 Jong, E.; Field, J.; Spinnler, H.E.; Winjberg, J.; Bont, J. (1994) Significant biogenesis of chlorinated aromatics by fungi in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 264-270.
- 33 Juanola, R.; Subirá, D.; Salvado, V.; Regueiro, G.; Anticó, E. (2002) Evaluation of an extraction method in the determination of the 2,4,6-trichloroanisole content of tainted cork. *J. Chromatogr. A*, 953, 207-214.
- 34 Caldentey, P.; Fumi, M.D.; Mazzoleni, V.; Careri, M. (1998) Volatile compounds produced by microorganisms isolated from cork. *Flavour and Fragr. J.*, 13, 185-188.
- 35 Bessey, E.A. (1950) *Morphology and Taxonomy of Fungi*. Hafner Press, New York, 498-501.

- 36 Juanola, R.; Guerrero, L.; Subirà, D.; Salvado, V.; Insa, S.; Garcia Regueiro, J.A; Anticó, E. (2004) Relationship between sensory and instrumental analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wine and cork stoppers. *Anal. Chim. Acta*, 513, 291-297.
- 37 Mazzoleni, V.; Pozo, P.C.; Careri, Monguzzi; Chialva, F. (1993) Studio della composizione chimica del sughero: composti volatili. *Il sughero in Enologia*, Symposium, Itália.
- 38 Vilela, A.; Mazzoleni, V.; Colagrande, O.; Faia, A.M. (1994) Compostos voláteis da rolha e sua incidência no vinho. *Ciência Téc. Vitiv.*, 11, 75-86.
- 39 Buser, H.R.; Zanier, C.; Tanner, H. (1982) Identification of 2,4,6-trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine. *J. Agric. Food. Chem.*, 30, 359-362.
- 40 Sung, Y.H.; Li, T.Y.; Huang, S.D. (2004) Analysis of earth and musty odors in water samples by solid phase microextraction coupled with gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Talanta*, 65, 518-524.
- 41 Amon, J.M.; Vandeppeer, J.M.; Simpson, R.F. (1989) Compounds responsible for cork taint. *Wine Ind. J.*, 4, 62-69.
- 42 Butzke, C.; Evans, T.; Ebeler, S. (1999) Detection of cork taint in wine using automated solid-phase microextraction in combination with GC/SIM. Chemistry of wine flavour. *ACS Symp. Series*, 714. Cap.15. 208-216.
- 43 Simpson, R.; Capone, D.; Sefton, M. (2004) Isolation and identification of 2-metoxi-3,5-dimethylpyrazine, a potent musty compound from wine corks. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5425-5430.
- 44 Chatonnet, P.; Bonnet, S.; Bouton, S.; Labadie, M.D. (2004) Identification and responsibility of 2,4,6-tribromoanisole in musty, corked odours in wine. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1255-1260.
- 45 Belardi, R.; Pawliszyn, J. (1989) The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid Transfer to capillary columns. *Water Pollut. Res. J. Can.*, 24, 179-191.
- 46 Arthur, C.; Pawliszyn, J. (1990) Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.*, 62, 2145-2148.
- 47 Bigham, S.; Medlar, J.; Kabir, A.; Shende, C.; Alli, A.; Malik, A. (2002) Sol-gel capillary microextraction. *Anal. Chem.*, 74, 752-761.
- 48 Gorecki, T.; Yu, X.; Pawliszyn, J. (1999) Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibers. *Analyst*, 124, 643-649.

- 49 Shirey, R. (2000) Optimization of extraction conditions for low molecular weight analites using solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. Sci.*, 38, 109-116.
- 50 Shirey, R. (2000) Optimization of extraction conditions and fiber selection for semivolatile analites using solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. Sci.*, 38, 279-288.
- 51 Rocha, S.; Ramalheira, V.; Barros, A.; Delgadillo, I.; Coimbra, M.A. (2001) Headspace solid phase microextraction (SPME) analysis of flavour compounds in wines. Effect of matrix volatile composition in the relative response factors in a wine model. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5142-5151.
- 52 Lord, H.; Pawliszyn, J. (1997) Method optimization for the analysis of amphetamines in urine by solid phase microextraction. *Anal. Chem.*, 69, 3899-3906.
- 53 Neto, P.V.; Cardoso, A.L. (1997) Alterações organolépticas: Perfil de concentrações de TCA e relação com a rolha. Actas do Congresso Int. da Cortiça. Lisboa, 354-361.
- 54 ISO 20752: Cork stoppers. Determination of releasable 2,4,6-trichloroanisole (2004) Genève, International Standardization Organization.
- 55 Fisher, C.; Fisher, U. (1997) Analysis of cork taint in wine and cork material at olfactory subthreshold levels by solid phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1995-1997.
- 56 Evans, T.; Butzke, C.; Ebeler, S. (1997) Analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wines using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 786, 293-298.
- 57 Burns, G. (1999) TCA In Corks, Cork Soaks and Bottled Wine. Reno- EUA, *ASEV Annual Meeting*.
- 58 Alzaga, R.; Ortiz, L.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, P.; Bayona, J. (2003) Accurate determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines at low parts per trillion by solid phase microextraction followed by GC-ECD. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3509-3514.
- 59 Hoffman, A.; Sponholz, W.R.; David, F.; Sandra, P. (2000) Corkiness in wine – trace analysis of 2,4,6-trichloroanisole by stir bar sorptive extraction (SBSE) and thermal desorption GC/MS. *Gerstel. App. Note*, 3/2000.
- 60 Zalacain, A.; Alonso, G.; Lorenzo, C.; Iñiguez, M.; Salinas, M. (2004) Stir bar sorptive extraction for the analysis of wine cork taint. *J. Chromatogr. A*, 1033, 173-178.

- 61 Riu, M.; Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. (2002) Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron-capture detection. *J. Chromatogr. A*, 977, 1-8.
- 62 Martinez-Uruñuela, A.; Pizarro, J.M. (2004) Optimization of a headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chloroanisoles related to cork taint in red wine. *J. Chromatogr. A*, 1056, 49-56.
- 63 Lizarraga, E.; Irigoyen, A.; Belsue, V.; Gonzalez-Penas, E. (2004) Determination of chloroanisole compounds in red wine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1052, 145-149.
- 64 Esquerro, O.; Tena, M.T. (2005) Determination of odour-causing volatile organic compounds in cork stoppers by multiple headspace solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A*, 1068, 201-208.
- 65 Kataoka, H.; Lord, H.; Pawliszyn, J. (2000) Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A*, 880, 35-62.
- 66 Pozo-Bayón, M.A.; Pueyo, E.; Martín-Alvarez, P.J.; Polo, M.C. (2001) Polydimethylsiloxane solid-phase microextraction - gas chromatography method for the analysis of volatile compounds in wines. Its application to the characterization of varietal wines. *J. Chromatogr. A*, 922, 267-275.
- 67 Syrres. (2003) Syracuse Research Corp. SRC environmental science, PhysProp Database, www.syrres.com.
- 68 Demyttenaere, J.; Dahger, C.; Sandra, P.; Kallinthraka, S; Verhé, R.; Kimpe, N. (2003) Flavour analysis of Greek white wine by solid-phase microextraction capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 985, 233-246.
- 69 Sérot, T.; Lafficher, C. (2003) Optimization of solid-phase microextraction coupled to gas chromatography for determination of phenolic compounds in smoked herring. *Food Chem.*, 82, 513-519.

Anexo

Tabela A1. Efeitos de interferência da variação da concentração do 3-metil-1-butanol sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz.

Concentração													Área			
mg/L	µg/L		µg/L		ng/L		ng/L		ng/L		ng/L		ng/L			
3-MB	1-Oct-3	1-Oct	Gua	MIB	TCA	Geo	3-MB	1-Oct-3	1-Oct	Gua	MIB	TCA	Geo			
47,7	26,7	78,0	19,4	30,0	7,4	31,4	5437211	6920248	24587544	2531245	681023	95212	351256			
							4817639	6854521	28515660	2412547	621302	92458	347412			
							5582425	6254523	27865874	2500271	642532	94521	295717			
							4902546	5986545	23658789	2432521	695218	85458	321401			
							5225485	6523214	25212546	2565878	712546	99745	349786			
71,6							6576491	6125452	22251258	2365889	642145	94585	341027			
							7851107	7125450	23833460	2545877	635623	96125	341021			
							7025463	7653259	29154584	2612452	676452	91252	301475			
							6985328	7653215	27658754	2551233	642545	86457	325474			
							6772563	6785421	26457852	2568999	675452	94245	340420			
95,4							9021475	6605236	24585992	2486423	675212	80325	320125			
							8542978	6975444	25232561	2515878	641251	94575	375410			
							9925459	7586542	26458785	2503250	661253	97412	314575			
							10255687	6896585	25568547	2515878	714212	95458	297845			
							10542365	7642137	27545252	2568321	675986	89658	312457			
143,0							14370994	7397414	23611430	2547889	685452	90120	354475			
							12565825	7154875	26494424	2496585	612545	97545	347512			
							11532542	7145212	26254221	2510353	602125	96458	297854			
							12865423	6542397	29854565	2543254	675452	91245	304121			
							12645873	7032148	24512354	2512455	712452	99654	312978			
191,0							19683402	6634950	25867905	2584125	685456	89563	300142			
							19021543	7024651	27587854	2615242	642548	87455	370150			
							15856859	6754284	25545657	2586429	652125	97542	354751			
							18312545	7214532	25565214	2543928	698545	91254	264779			
							17429482	6768152	22852566	2513654	635489	96325	351010			

Tabela A4. Efeitos de interferência da variação da concentração do guaiacol sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz

Concentração							Área							
mg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	ng/L	ng/L	µg/L	µg/L	1-Oct	1-Oct-3	Gua	MIB	TCA	Geo
3-MB	95,4	26,7	78,0	5,7	30,0	7,4	31,4	15986551	8466424	30631904	440754	686598	95642	352141
								18143164	8719977	30539380	440797	654521	94250	325474
								15212412	8451211	30210211	420121	625686	90312	302547
								18545212	8721236	29865688	402125	678565	94216	332157
								17432566	8965239	30532549	412542	645854	90754	397445
				12,9				18640792	9212546	31127032	1265459	678545	98652	314587
								17489722	8953365	35385780	1154524	612545	87454	342158
								16585477	9102124	31865878	1251251	689545	89715	345877
								16896566	8685412	30569895	1242355	675222	90541	397451
								17212565	9012547	34652125	1145872	598745	89654	347545
				19,4				16238445	9232125	31350068	1942126	587542	91854	310214
								17052738	8563254	32896525	1802124	668545	89542	325488
								17545211	8956255	30885822	1985657	686325	87256	341784
								16421215	8645798	32547856	1863654	645875	90214	374589
								16523250	9012124	30545202	2052121	685458	97542	341257
			38,7					17324734	8917276	30431896	3602125	684574	95821	374125
								15914472	9667036	32594180	3307090	740215	93254	354587
								18212415	9212545	30986588	3523250	645212	98745	310244
								17542123	9021210	32548785	3253256	676589	94212	355597
								17023258	9125412	33585256	3502547	586452	93251	312402
				51,6				17961930	8692805	31954706	4402121	596865	94575	357477
								17542152	8312542	34856544	4225452	612545	91254	340124
								18131359	8552125	32125454	4212410	675855	89352	330338
								18562354	8210236	31625487	4625211	702127	90254	341254
								19077084	8523654	33997092	3986587	642135	97545	310240

Tabela A5. Efeitos de interferência da variação da concentração do 2-metilisoborneol sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz

Concentração										Área			
mg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L				
3-MB	1-Oct-3	1-Oct	Gua	MIB	TCA	Geo	3-MB	1-Oct-3	1-Oct	Gua	MIB	TCA	Geo
95,4	26,7	78,0	19,4	8,0	7,4	31,4	15246982	854512	30215215	2458785	314112	99458	350212
							16425987	765821	35321412	2658785	301254	91245	305421
							19452365	745854	34758452	3002154	338545	94574	340127
							18654787	801254	32547870	2689542	314585	91246	321022
							16985658	712545	30215548	2765875	355214	87458	321449
				20,0			18564287	812021	35212545	2985458	404582	94212	325410
							18854523	953254	30215472	2458741	397417	97856	314571
							19745875	658458	32454558	2685402	412549	92785	345201
							15487638	686585	38454215	2874456	447542	84573	356459
							16458754	701250	32545845	2458744	410254	89754	310442
				30,0			17858562	792545	32548775	2713544	548541	94257	371026
							14523698	751254	30548751	2754745	525452	92758	310245
							16879502	756545	32978545	2454513	554788	90457	344713
							17546328	748458	31254587	2685498	591259	92120	369810
							19865235	821254	32545875	2879653	574258	93125	310211
				60,0			18876392	701252	29954545	2647898	785421	90412	312404
							16478955	754586	31025456	2598963	821245	91254	351020
							16487522	754585	35685459	2457854	892533	93301	341258
							18976532	851021	31245899	2699656	851254	93421	347542
							17236545	785452	30124747	2789856	875277	89633	365481
				80,0			19876425	701253	29854587	2974585	932541	87542	310214
							18755564	754211	32698754	2468520	978744	93754	387822
							18475460	821254	33125487	2647802	971235	89645	310254
							15542566	865799	32568548	2497856	997124	87548	301277
							16854785	701231	30214520	2730547	910241	98254	370128

Tabela A6. Efeitos de interferência da variação da concentração do 2,4,6-tricloroanisole sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz

Concentração										Área			
mg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L				
3-MB	1-Oct-3	1-Oct	Gua	MIB	TCA	Geo	3-MB	1-Oct-3	1-Oct	Gua	MIB	TCA	Geo
95,4	26,7	78,0	19,4	30,0	2,0	31,4	19856547	785458	32012152	2754844	687545	45236	354584
							17054879	856452	30054587	2315475	568545	47521	310244
							18564751	901254	30124556	2548755	642548	49702	314721
							16745785	785458	36548795	2468573	782569	44549	384110
							19421251	710214	32125456	2685457	645854	44013	341251
					5,0		18487536	785452	36588787	2145452	698565	67012	301257
							17458758	795688	34212548	2658785	645232	61187	347845
							18564220	754215	31254795	2978545	712452	69120	396417
							19745721	802896	30215478	2685855	764521	66474	330244
							15654582	841341	35689712	2758548	701225	60803	310214
						7,4	16485954	856428	34785898	2457854	685454	92147	397222
							17548502	865997	31254782	2685458	665412	93478	341017
							19485233	768996	30212545	2798754	878545	99712	310557
							19452530	857560	35648754	2854785	658545	90125	305878
							17565855	784623	31024554	2647550	587854	89125	301414
					14,8		19685232	784215	34587854	2775469	569856	158744	341252
							18659555	898564	30212545	2465851	645214	164215	302147
							16458785	885642	31254587	2548962	698545	175482	339885
							16522325	845252	34212156	2451210	632545	161032	397451
							19566323	756520	30021254	2878564	598784	170351	358745
					19,8		18754585	785458	30021254	2498575	593217	221452	351240
							19856547	768542	35212478	2878541	673125	214709	314541
							19487546	854220	31021254	2645200	648976	237475	354112
							15758565	798642	30212458	2741542	587854	209786	317457
							17685489	774501	35421202	2458546	612548	228014	324106

Tabela A7. Efeitos de interferência da variação da concentração da geosmina sobre as áreas cromatográficas dos restantes constituintes da matriz

Concentração										Área				
mg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L					
3-MB	1-Oct-3	1-Oct	Gua	MIB	TCA	Geo	3-MB	1-Oct-3	1-Oct	Gua	MIB	TCA	Geo	
95,4	26,7	78,0	19,4	30,0	7,4	8,4	16989555	754854	31254542	2645745	586452	94521	285472	
							20578565	764582	30212548	2458785	598575	86457	278543	
							16458545	897564	35487546	2965899	654525	91024	298756	
							19856585	910421	30125457	2785012	648754	87223	301452	
							19248512	854521	34212578	2689545	598783	97120	321458	
						21,0	19856452	864521	29754235	2475865	648288	99471	354741	
							18754585	785462	31025487	2702358	646647	85426	321458	
							17585869	854523	35452174	2685459	586732	91029	361202	
							19856854	985450	31254525	2747589	607542	87454	337412	
							20006522	789656	32254125	2478545	675987	84021	321018	
						31,4	18658477	856202	30012548	2689548	602158	85747	371455	
							19094525	981202	35212477	2687854	635986	94201	341008	
							18988754	754230	33458423	2665845	698699	90124	352019	
							17785465	747401	34587210	2614528	676686	88002	360148	
							17482328	902125	31021452	2858796	598986	87403	396541	
						63,0	19856580	871250	30025487	2568845	602355	96489	478717	
							17843021	764425	31754856	2678944	587852	80247	461023	
							16484351	940121	30254774	2654877	658940	89719	502021	
							19874521	747500	33021457	2648530	587854	91204	468559	
							17458544	875127	35448745	2898775	645213	90120	477077	
						84,0	18310025	852077	29985475	2658780	668545	94574	558212	
							18745212	754542	31212452	2489565	612002	99870	523203	
							19567482	910254	31254547	2978551	598551	90314	521200	
							18754231	856455	34212542	2698540	597854	87453	550226	
							19502334	795433	33587854	2698587	646642	84011	521207	

Tabela A8. Dados estatísticos para o modelo de regressão proposto para o 3-metil-1-butanol

	Coeficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P
Interceptar	17291984,2	9518029,6	1,82	0,07
3-MB	30132,9	43882,1	0,69	0,49
1-Oct-3	4841,1	217895,9	0,02	0,98
1-Oct	52903,2	31565,5	1,68	0,10
Gua	-46407,0	128971,3	-0,36	0,72
MIB	-6809,9	16637,3	-0,41	0,68
TCA	-17500,4	47808,3	-0,37	0,72
Geo	-4926,8	15845,1	-0,31	0,76

Tabela A9. Dados estatísticos para o modelo de regressão proposto para o 1-octeno-3-ol

	Coeficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P
Interceptar	860855,0	2747252,0	0,31	0,75
3-MB	13567,3	12666,0	1,07	0,29
1-Oct-3	132025,6	62892,8	2,10	0,04
1-Oct	16242,1	9111,0	1,78	0,08
Gua	78911,9	37225,9	2,12	0,04
MIB	-8956,5	4802,1	-1,87	0,06
TCA	-25408,1	13799,2	-1,84	0,07
Geo	-8382,1	4573,5	-1,83	0,07

Tabela A10. Dados estatísticos para o modelo de regressão proposto para o guaiacol

	Coeficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P
Interceptar	1998029,7	390985,3	5,11	8,72E-07
3-MB	42,5	1802,6	0,02	0,98
1-Oct-3	-2940,7	8950,8	-0,33	0,74
1-Oct	-8946,3	1296,7	-6,90	1,03E-10
Gua	66783,9	5297,9	12,61	4,98E-26
MIB	55,2	683,4	0,08	0,94
TCA	531,6	1963,9	0,27	0,79
Geo	265,8	650,9	0,41	0,68

Tabela A11. Dados estatísticos para o modelo de regressão proposto para 2-metilisoborneol

	Coeficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P
Interceptar	636731,7	54724,2	11,64	2,70E-23
3-MB	40,0	252,3	0,16	0,87
1-Oct-3	-1193,1	1252,8	-0,95	0,34
1-Oct	-2070,2	181,5	-11,41	1,18E-22
Gua	57,5	741,5	0,08	0,94
MIB	1546,6	95,7	16,17	5,38E-36
TCA	-405,6	274,9	-1,48	0,14
Geo	-64,0	91,1	-0,70	0,48

Tabela A12 Dados estatísticos para o modelo de regressão proposto para o 1-octanol

	Coeficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P
Interceptar	21321948,0	3671143,0	5,81	3,12E-08
3-MB	-23743,2	16925,5	-1,40	0,16
1-Oct-3	-148437,3	84043,4	-1,77	0,08
1-Oct	158284,0	12174,9	13,00	3,82E-27
Gua	63132,4	49744,8	1,27	0,21
MIB	1425,8	6417,1	0,22	0,82
TCA	12647,6	18439,9	0,69	0,49
Geo	4168,1	6111,5	0,68	0,50

Tabela A13. Dados estatísticos para o modelo de regressão proposto para o 2,4,6-tricloroanisole

	Coeficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P
Interceptar	77606,5	12830,8	6,05	9,30E-09
3-MB	-20,7	59,2	-0,35	0,73
1-Oct-3	-80,1	293,7	-0,27	0,79
1-Oct	-553,6	42,6	-13,01	3,61E-27
Gua	-61,8	173,9	-0,36	0,72
MIB	-16,4	22,4	-0,73	0,47
TCA	1406,0	64,5	21,82	9,36E-51
Geo	-16,0	21,4	-0,75	0,45

Tabela A14 Dados estatísticos para o modelo de regressão proposto para a geosmina

	Coeficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P
Interceptar	385090,9	41613,7	9,25	1,02E-16
3-MB	-201,3	191,9	-1,05	0,30
1-Oct-3	-1092,1	952,7	-1,15	0,25
1-Oct	-709,7	138,0	-5,14	7,51545E-07
Gua	-511,9	563,9	-0,91	0,365254777
MIB	-37,3	72,7	-0,51	0,609003217
TCA	-166,7	209,0	-0,80	0,42633109
Geo	659,9	69,3	9,52	1,88234E-17